

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

VILMA CLEMI COLLI

**ANÁLISE DA AÇÃO DA OCITOCINA SOBRE A REMODELAÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR EM RATAS WISTAR DE 12, 18 E 24 MESES.**

Araçatuba/SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

VILMA CLEMI COLLI

**ANÁLISE DA AÇÃO DA OCITOCINA SOBRE A REMODELAÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR EM RATAS WISTAR DE 12, 18 E 24 MESES.**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Cássia

Menegati Dornelles

Co-orientadora: Profa. Dra. Poli Mara

Spritzer

Araçatuba/SP

2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Rita Cassia Menegati Dornelles

(presidente e orientadora)

Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro

(membro)

Prof. Dra. Roberta Okamoto

(membro)

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

(membro)

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori

(membro)

Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

(suplente)

Prof. Dra. Maria Marta Sarquis Soares

(suplente)

Prof. Dra. Maria Lucia Fleiuss de Farias

(suplente)

DEDICATÓRIA

Para
Antônio Gualti Filho,
O grande parceiro desta etapa!

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades!
Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me fez perseverar neste objetivo, vigiou meus caminhos, livrou-me dos perigos e aqueceu meu coração nos momentos árdusos.

Aos **meus pais** *in memoriam*, pelas sementes de determinação, espírito de luta, dignidade e honra com que nos infundiram o amor à vida, à ciência, ao trabalho e principalmente às criaturas.

À minha filha **Laura**, amiga de lado a lado nesta luta.

Ao meu filho **Leonardo**, aos meus irmãos **Aldo** e **Valdenice**, à minha cunhada **Silvana** pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus sobrinhos **Alan** e **Artur** por tornarem tudo doce e ao mesmo tempo *light*.

À **Meire**, pela torcida imensa e pela prontidão.

À profa. Dra. **Denise Pedrini** por ter me apresentado ao programa e pelas palavras amigas e sábias durante as dificuldades.

Aos amigos e companheiros do **Instituto de Criminalística do Núcleo de Araçatuba** pelo incentivo, paciência, solidariedade e boa vontade.

Aos coordenadores da UNIP, em especial ao **Cezar** pela compreensão e por todo esforço nos ajustes de horários.

Aos inigualáveis **Gilmar** e **Dirce** protagonistas de boa vontade e fraternidade.

Aos grandes parceiros **Claudiel** e **Luciana**, por todo o auxílio e pela amizade.

Ao **Camilo** pela ética no trabalho com o biotério e com os animais.

Aos colegas, **Ângela, Ariana, Ariane, Camila, Caril, Dayse, Eduardo, Felipe, Gean, Natália, Samuel, Simone, Talita, Thais e Wagner** e aos demais companheiros desta jornada, pelos momentos de partilha, colaboração e convivência.

A todos os **professores** de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba que de alguma forma participaram desta trajetória.

Aos **funcionários** que conosco conviveram neste período muitas vezes executando trabalho mudo que nos foi essencial.

À **Valéria, Cristiane** e **Lilian** pela boa vontade, educação e empenho com que nos atenderam e auxiliaram na seção de pós-graduação.

À **Ana Cláudia M. Grieger Manzatti** pela atenção e colaboração.

Ao prof. Dr. **Marcelo Macedo Crivelini** e ao seu colaborador e xará, **Marcelo**, pelo incentivo e apoio nas análises microscópicas.

Ao prof. Dr. **Guilherme de Paula Nogueira** e sua fiel escudeira **Devanir** pela colaboração e boa vontade.

Ao prof. Dr. **José Antunes Rodrigues** por ter possibilitado as reações de radioimunoensaio.

À profa. Dra. **Roberta Okamoto**, pela valiosa colaboração na conclusão deste estudo.

Ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação e à Faculdade de Odontologia de Araçatuba- FOA - UNESP pela oportunidade.

À CAPES pelo apoio financeiro

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Rita Cássia Menegati Dornelles**, pela dedicação, empenho, firmeza, integridade e honra com que conduziu estes trabalhos.

À **Bruna**, por toda ajuda, pelo apoio, pela cumplicidade, pelos choros e risos e, sobretudo, pela grande amizade.

A todos que com paciência e grandeza suportaram minhas inquietudes, derramaram-me estímulos e se alegraram nesta conquista. De modo especial á amiga **Fátima**.

SUMÁRIO

páginas

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIÇÕES

RESUMO

ABSTRACT

1. REVISÃO DE LITERATURA	21
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODO	29
Grupos experimentais	29
Procedimentos Laboratoriais	31
Análise Histomorfométrica	33
Análise Imunohistoquímica	34
Análise Estatística	35
4. DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS	36
Cálcio e fósforo	36
Fosfatase alcalina, osteoprotegerina e osteocalcina	36
Fosfatase ácida resistente ao tartarato	37
Histomorfometria	37
Imunohistoquímica	38
Ocitocina	39
Estrógeno	40
5. DISCUSSÃO	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ANEXO	69
ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	70

-
- Figura 01.** Sequência de eventos 31
- Figura 02.** Esquema do alvéolo dividido nos terços apical (I), médio (II) e cervical (III) delimitados por medidas de 1/3 da maior curvatura palatina (a) e 1/3 da menor curvatura palatina (b) 33
- Figura 03.** Concentração plasmática de cálcio e fósforo de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoniais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos 41
- Figura 04.** Concentração plasmática dos marcadores bioquímicos de formação óssea (FAL, OPG e OC) de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoniais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. [♦] P< 0,05 vs 12/SF; ^ΔP<0,05 vs 12/OT; ^{*} P< 0,05 vs 18/SF; [□] P< 0,05 vs 18/OT; [•] P< 0,05 vs 24/SF. 42
- Figura 05.** Determinação sérica de TRAP de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoniais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. [♦] P< 0,05 vs 12/SF; ^{*} P< 0,05 vs 18/SF; [•] P< 0,05 vs 24/SF. 43
- Figura 06.** Formação óssea no terço médio do alvéolo de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoniais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. [♦] P< 0,05 vs 12/SF; ^{*} P< 0,05 vs 18/SF; [•] P< 0,05 vs 24/SF. 43
- Figura 07.** Terço médio alveolar de ratas dos grupos: controle 12 meses (A), tratado 12 meses (B), controle 18 meses (C), tratado 18 meses (D), controle 24 meses (E) e tratado 24 meses (F), 28 dias após exodontia (35 dias após OT-animais tratados e SF-animais controles). Notar o osso trabecular neoformado (BT) e o tecido conectivo (CT). Cortes histológicos com 6 µm. Hematoxilina e eosina 100x. 44
- Figura 08.** Cortes histológicos (6 µm) do terço médio alveolar de ratas de 12 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT- tratados ou SF-controles) mostrando imunomarcagem para osteocalcina. Notar que no grupo 45

controle (A-100x e C-200x) a imunomarcaco não difere do grupo tratado (B-100x e D-200x), mostrando que o processo de mineralizao não diferiu entre os grupos quando se considera este marcador.

- Figura 09.** Cortes histológicos (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 12 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicao de OT- tratados ou SF-controles) mostrando imunomarcaco para TRAP. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) o número de osteoclastos marcados  semelhante ao número do grupo tratado (B-100x e D-200x), mostrando que o processo de reabsoro não diferiu entre os grupos quando se considera este marcador. **46**
- Figura 10.** Cortes histológicos (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 18 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicao de OT- tratados ou SF-controles) mostrando imunomarcaco para osteocalcina. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) a imunomarcaco  discreta e inferior ao grupo tratado (B-100x e D-200x), mostrando maior processo de mineralizao do grupo tratado. Osteoblastos são positivos para esta proteina. **47**
- Figura 11.** Cortes histológicos (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 18 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicao de OT-tratados ou SF-controles), mostrando a imunomarcaco para TRAP. Notar que nos controles (A-100x e C-200x) há aumento no número de osteoclastos representando processo de reabsoro mais intenso em relao aos animais do grupo tratado (Bx100 e Dx200) **48**
- Figura 12.** Cortes histológicos (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 24 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicao de OT- tratados ou SF-controles) mostrando imunomarcaco para osteocalcina. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) quase não se observa imunomarcaco enquanto no grupo tratado (B-100x e D-200x) quantidade bem maior desta proteina  observada, mostrando que no grupo tratado houve aumento de marcao desta proteina na matriz mineralizada e nos osteoblastos indicando maior processo de mineralizao nestes animais. **49**
- Figura 13.** Cortes histológicos (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 24 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após **50**

aplicação de OT- tratados ou SF-controles) mostrando imunomarcção para TRAP. Notar no grupo controle (A-100x e C-200x) grande número de osteoclastos com marcação positiva para TRAP é observado, representando intensa atividade de reabsorção óssea. No grupo tratado (B-100x e D-200x) o número de osteoclastos marcados é menor e praticamente ausente nas proximidades do osso trabecular, indicando atividade reabsortiva reduzida em relação ao grupo controle.

- Figura 14.** Determinação plasmática de ocitocina de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. **51**
♦P<0,05 vs 12/SF; ^ΔP<0,05 vs 12/OT; * P< 0,05 vs 18/SF; [□]P< 0,05 vs 18/OT; • P< 0,05vs 24/SF
- Figura 15.** Determinação plasmática de estrógeno de ratas com 12, 18 e 24 meses que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N = 8 animais/grupo. ♦ P< 0,05 vs 12/SF **52**

LISTA DE TABELAS

páginas

Tabela 01. Distribuição dos grupos e tratamento

30

LISTA DE ABREVIações

ANOVA – Análise de variância

BRUs - Unidades de Remodelamento Ósseo

CEEA - Comitê de Ética Experimental Animal

ELISA - Imunoensaio em sanduiche com enzima ligada

EPM – Erro padrão da média

FAL - Fosfatase alcalina

OC - Osteocalcina

OPG - Osteoprotegerina

OT – Ocitocina

OTRs - Receptores funcionais para ocitocina

pH - Potencial hidrogeniônico

RANK – Receptor ativador do fator kappa B nuclear

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear

SF – Solução fisiológica

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

i.m. – intra-muscular

i.p. – intra-peritonia

mL – mililitro

V/V – volume a volume

nm - nanômetros

mg/dL – miligramas por decilitro

U/L – unidades por litro

ng/mL – nanogramas por mililitro

pg/mL – picogramas por mililitro

Colli, Vilma Clemi. **Análise da ação da ocitocina sobre a remodelação óssea alveolar em ratas wistar de 12, 18 e 24 meses.** 2012. 70f. Tese (doutorado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

RESUMO

A ação da ocitocina (OT) como regulador direto da massa óssea foi reportada em roedores jovens e este efeito anabólico foi atribuído à ação periférica deste hormônio. O objetivo deste estudo foi investigar a ação periférica de OT no processo de reparo alveolar de ratas Wistar de 12, 18 e 24 meses. Ratas de 12 meses com ciclo estral normal e ratas de 18 e 24 meses em diestro permanente receberam duas injeções intra-peritoniais (12 horas de intervalo) de salina (NaCl 0,15M – grupos controle) ou OT (134 μ g/Kg – grupos tratados). Sete dias após, o incisivo direito foi extraído e as análises foram realizadas com 28 dias de reparo alveolar (35 dias após administração de salina ou OT). Os resultados plasmáticos de cálcio e fósforo não diferiram entre os grupos. Os marcadores bioquímicos sistêmicos de formação óssea, fosfatase alcalina (FAL) e osteocalcina (OC), não revelaram diferença significativa de valores na comparação entre grupos controle e tratado de 12 meses, porém esta diferença foi significativa para os dois marcadores quando os animais tratados de 18 e 24 meses foram comparados com os respectivos controles. A análise histomorfométrica e a reação de imunohistoquímica contra OC confirmaram estes resultados mostrando que o tratamento com OT, promoveu maior formação óssea nos animais de 18 e 24 meses. O marcador sistêmico de reabsorção óssea, fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) não foi

estatisticamente diferente entre animais dos grupos controle e tratado de 12 e 18 meses, porém nos de 24 meses este valor foi significativamente menor nos animais tratados indicando diminuição de reabsorção por ação de OT nos animais desta idade. A imunomarcção para TRAP realizada nos cortes alveolares confirmou os resultados do marcador sistêmico no grupo de 12 meses e no de 24 meses. No grupo de 18 meses este resultado foi discrepante, vez que os animais do grupo controle demonstraram maior número de osteoclastos marcados indicando com maior fidedignidade ação anti-reabsortiva de OT. Estes resultados sugerem ação anabólica e anti-reabsortiva nos animais de 18 e 24 meses por ação de OT periférica. A concentração plasmática de osteoprotegerina (OPG) não diferiu entre os grupos, exceto pelo fato de que os animais de 24 meses tratados apresentaram os maiores valores. A dosagem sanguínea de OT não revelou diferença significativa de valores com exceção dos de 24 meses que apresentaram valores maiores com em relação aos demais grupos, bem como os animais desta idade tratados com OT tiveram concentrações maiores deste hormônio em relação aos respectivos controles. As dosagens de estrógeno não diferiram entre os grupos, exceto o grupo controle de 12 meses que apresentou as maiores concentrações em relação aos demais, o que poderia ser explicado pela regularidade do ciclo estral destes animais. A análise conjunta dos resultados mostra que OT promoveu formação e diminuiu a atividade osteoclástica em animais de 18 e 24 meses.

Palavras chave: Regeneração óssea. Ocitocina. Extração dentária

Colli, Vilma Clemi. **Analysis of oxytocin's action on bone alveolar remodeling in Wistar rats of 12, 18 and 24 months.** 2012. 70f. Tese (doutorado). Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

ABSTRACT

The action of oxytocin (OT) as a direct regulator of bone mass has been reported in young rodents and this anabolic effect was attributed to the peripheral action of this hormone. The aim of this study was to investigate the peripheral action of OT in the process of alveolar repair of Wistar rats with 12, 18 and 24 months. Rats of 12 months with normal estrous cycle and rats with 18 and 24 months in permanent diestrus received two intra-peritoneal injections (12 hours apart) of saline (NaCl 0.15 M - control group) or OT (134 μ g / kg - treated groups). Seven days later, the right incisor was extracted and the analyzes were performed with 28 days of alveolar repair (35 days after administration of saline or OT). The plasma results of calcium and phosphorus did not differ between groups. The systemic biochemical bone formation markers, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC), revealed no significant difference of values in animals of 12 months, but this difference was significant for both markers when treated animals of 18 and 24 months were compared to controls. The histomorphometric analysis and immunohistochemical reaction against osteocalcin confirmed these results showing that treatment with OT, promoted greater bone formation in animals with 18 and 24 months. The systemic marker of bone resorption, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was not statistically different between

animals of the control and treated groups of 12 and 18 months, but in 24 months the values were significantly lower in treated animals indicating decreased resorption action of OT in animals of this age. The immunostaining for TRAP performed on alveolar cuts confirmed the results of the results of systemic markers in groups of 12 and 24 months. In the group of 18 months this result was discrepant, since the control group showed a greater number of marked osteoclasts indicating with more reliability the anti-reabsorptive action of OT. These results suggest anabolic and anti-resorption in animals 18 and 24 months by the action of peripheral OT. The plasma concentration of osteoprotegerin (OPG) did not differ between groups, except for the fact that animals treated for 24 months showed the highest values. The dosage of blood OT revealed no significant difference of values with the exception of 24 months which were higher compared with the other groups as well as the animals treated with OT in that age had higher concentrations of this hormone in relation to their respective controls. The doses of estrogen did not differ between the groups except the control group of 12 months that had the highest concentrations in relation to others, which could be explained by the regularity of the estrous cycle of these animals. The analysis of the results shows that OT promoted formation and decreased osteoclast activity in the 18 and 24 months animals.

Key words: Bone regeneration. Oxytocin. Tooth extraction

1- REVISÃO DE LITERATURA

A osteoporose é doença esquelética sistêmica que resulta em aumento da fragilidade óssea e risco de fratura subsequente à diminuição da massa óssea e à degradação da microarquitetura óssea (FREEMANTLE et al., 2010). É problema de saúde pública por estar diretamente ligada ao bem estar e qualidade de vida e dificultar as atividades cotidianas do paciente (NAVEGA & OISHI, 2007).

Apesar da disponibilidade de várias opções de tratamento as taxas anuais de fratura de quadril previstas para 2050 em função da osteoporose, são superiores a seis milhões configurando questão de tópico científico, social e econômico, o que ressalta a extrema importância de estudar os fatores que regulam a massa óssea para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (NEER et al., 2001; ROUX et al., 2007).

O osso é constituído por tecido dinâmico e sua integridade é assegurada pela modelação e remodelação óssea. Durante o crescimento do organismo, até o osso atingir forma e tamanho, ocorre processo denominado de modelação, ou seja, há remoção do osso de um local e deposição em outro. Durante a maturidade esquelética, a regeneração continua a ocorrer através da remoção e posterior substituição do osso existente por osso novo, pelo processo de remodelação (MANALOGAS, 2000). A quantidade de tecido ósseo durante o crescimento e a remodelação do esqueleto é determinada pelo equilíbrio entre taxa de formação e reabsorção óssea (RAISZ, 2005). Desta forma, ao longo da vida, o tecido ósseo é continuamente renovado através deste ciclo de remodelamento ósseo, caracterizado pela sequência de eventos

ativação-reabsorção-formação (MARTIN, 2007). Este processo ocorre em sítios das superfícies ósseas, nas unidades de remodelamento ósseo (BRUs, *bone remodeling units*) e envolve a interação constante das atividades dos osteoblastos e osteoclastos (DATTA et al., 2008).

Sinais físicos e hormonais determinam o recrutamento das células precursoras de osteoclastos para a região da superfície óssea que será reabsorvida, onde se fundem e transformam-se em osteoclastos multinucleados. Fatores liberados pelos osteoblastos e o contato célula a célula estão relacionados à ativação osteoclástica (FULLER et al., 1991). A interação do ligante do receptor ativador do fator kappa B nuclear (RANKL) com o receptor ativador do fator kappa B nuclear (RANK), presente na superfície de precursores de osteoclastos, resulta na inibição da apoptose dos osteoclastos e estimulação na diferenciação e ativação dessas células. Efeitos antagônicos resultam da ligação de RANKL com OPG. Diversas citocinas e compostos, como os estrógenos, influenciam a gênese de osteoclastos por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos (KWAN et al., 2004). Os osteoclastos reabsorvem o osso e formam a lacuna de Howship, com liberação elevada de cálcio local ou substâncias liberadas pela própria matriz (BANDEIRA; CARVALHO, 2007). A seguir, os osteoclastos sofrem apoptose e finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) que, após período de amadurecimento (aproximadamente 10 dias), será mineralizada. Ao final de cada ciclo de remodelação, a quiescência é restaurada com consequente manutenção da integridade óssea (MEGHJI, 1992; MUNDY; OYAJOB, 2003).

Alterações nos mecanismos de remodelamento ósseo podem ocasionar a osteoporose. A mais comum é a osteoporose tipo I que ocorre na mulher recentemente menopausada em função da rápida perda óssea geralmente relacionada com a diminuição da concentração plasmática de estrogênio e à alteração da homeostasia óssea relacionada à idade (GALI, 2001; LANZILLOTT et al., 2003). A principal ação do estrógeno no metabolismo ósseo é inibir a reabsorção por ação sobre os osteoclastos e induzir sua apoptose, com redução da vida útil desta célula (FITZPATRICK, 2006).

Ao longo de envelhecimento, o osso sofre uma série de alterações bioquímicas que podem ser responsáveis pelo declínio do desempenho mecânico deste tecido, conduzindo a aumento na incidência de fraturas em idosos (SINGER et al., 1998). Uma vez que o osso é material composto de mineral e de matérias orgânicas, alterações nos seus constituintes, inevitavelmente, modificam seu comportamento biomecânico. O colágeno, que representa 90% da fase orgânica no osso, é susceptível a modificações pós-traducional, que incluem a glicação não-enzimática. Através da presença de açúcares redutores na matriz extracelular, a glicação não-enzimática provoca a formação de produtos finais de glicação que estão presentes como ligações cruzadas intra e inter-fibrilares entre as fibras de colágeno (BAILEY et al., 1998; TANG et al., 2007). Foi demonstrado que estes produtos se acumulam com a idade e influenciam negativamente as propriedades bioquímicas e mecânicas de membrana basal, tendão, cartilagem articular da pele, tecido cardiovascular, tecido conjuntivo e osso cortical (TANG et al., 2007; WANG et al., 2002). Alterações da rede orgânica no osso, causadas por estes produtos podem ser

relevantes para maior fragilidade óssea com o envelhecimento (TANG et al., 2007). As evidências sugerem que OC atue como reguladora da fase mineral e uma vez depositada no esqueleto só é substituída durante a remodelação óssea. Como tal, OC pode atuar na regulação homeostática das trocas ósseas de cálcio. Aumento na glicação não enzimática pode alterar a afinidade desta proteína para hidroxiapatita e desta forma a osteocalcina poderia estar envolvida na patogênese da osteoporose senil (GUNDBERG et al., 1986).

À medida que o processo da remodelação óssea vem sendo elucidado desencadeou-se o uso racional de drogas chamadas anti-reabsortivas e drogas anabólicas para o tratamento da osteoporose. Estas terapias objetivam o aumento da densidade óssea atuando na diminuição da reabsorção ou no aumento na formação óssea (POOLE et al., 2011; ROBERTS et al., 2009). Ao reduzir a atividade osteoclástica os agentes anti-reabsortivos permitem que as lacunas ósseas sejam preenchidas por osso novo antes que outro ciclo de remodelação se inicie (BOONEN et al., 2004). Já os agentes anabólicos agem aumentando a deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos em cada ciclo de remodelação (DELMAS, 2002; RUSSO, 2001).

Ainda existem muitas lacunas nestes tratamentos e diversos modelos animais têm sido propostos para estudo da remodelação. Aliado à indução de osteoporose por ovariectomia, o uso de ratas senis tem sido recomendado, pois ao contrário do que se pensava, o esqueleto deste roedor se remodela de maneira semelhante ao de humanos (BARON et al., 1984). Alguns autores argumentam que em ratas senis não haveria osso esponjoso suficiente para estudo, porém este problema é observado apenas como resultado de repetidas reproduções (BINKLE; KIMMEL, 1994).

Paralelamente aos modelos animais, diversos parâmetros têm sido propostos para avaliar a atividade óssea. A taxa de renovação óssea é refletida no sangue e na urina com alteração dos níveis de enzimas, minerais e outras substâncias envolvidas na deposição e reabsorção ósseas (AL-SHOUMER et al., 2006; SARAIVA; LAZARETTI, 2002). Estas substâncias são os chamados marcadores do metabolismo ósseo e quantificam em tempo real a atividade de formação ou reabsorção das células ósseas (COLEMAN, 2002). Correspondem a enzimas expressas por osteoblastos e osteoclastos, ou compostos orgânicos liberados durante a síntese e reabsorção da matriz óssea. Podem ser agrupados em marcadores de formação e marcadores de reabsorção óssea (ALLEN, 2003; DELMAS, 2002; SEIBEL, 2000).

Estudos ainda são necessários para indicar qual a melhor combinação de marcadores seria a ideal para pesquisas envolvendo o tecido ósseo, porém a utilização combinada de marcador de formação com marcador de reabsorção tende a fornecer resultados mais fidedignos. Dentre os marcadores de formação óssea encontram-se a FAL a OPG e mais rotineiramente a OC.

Dentre os marcadores bioquímicos de reabsorção óssea, a determinação da atividade da TRAP ocupa lugar de destaque. A TRAP é considerada marcador útil embora não específico da reabsorção óssea, já que isoenzimas da fosfatase ácida são encontradas em tecidos e células que incluem além dos osteoclastos, fígado, baço, rins, próstata, plaquetas e eritrócitos, entre outros (HALLEEN et al., 2001).

Os marcadores ósseos circulantes refletem a remodelação de todo o esqueleto, porém o estado local de determinada região óssea é melhor avaliado através de dados histomorfométricos e de colorações ou reações

específicas como as de imunohistoquímica (DI DIO et al., 1994). Um dos modelos propostos para estes estudos considera o reparo alveolar pós exodontia (OKAMOT; RUSSO, 1973). Após a exodontia, considera-se completa a reparação do alvéolo quando este se encontra totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada. Isto ocorre por volta de 28 dias pós-exodônticos no rato, 48 dias no cão e 64 dias no homem (HSIEH et al.,1994; OKAMOTO; FIALHO, 1990). Nestes alvéolos podem-se estudar as reações locais do processo de cicatrização e através de reações direcionadas avaliar o processo de remodelamento ósseo.

Apesar destas ferramentas para o estudo do metabolismo ósseo e de se conhecer que a função das células ósseas é alterada sistemicamente por ação de várias substâncias e localmente por vários reguladores (LORENZO et al., 2008), as terapias para osteoporose, em especial as que atuam sobre a formação óssea têm sido continuamente estudadas com a finalidade de se obter melhores respostas. Drogas com efeito anti-reabsortivo são mais utilizadas na rotina e pesquisas direcionadas a tratamentos que promovam formação óssea têm sido incentivadas.

Um dos candidatos importantes para este efeito é ocitocina (OT) (DURSUN et al., 2005). Em adição para seus efeitos bem conhecidos durante trabalho de parto e lactação (IMAMURA et al., 2000) foi reportado que OT está implicada nos processos neuroadaptativos mostrando largo espectro de efeitos centrais e periféricos (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; JENKINS & NUSSEY 1991). Estes efeitos são mediados por receptores de superfície celular específicos presentes em diferentes tecidos (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Receptores funcionais de ocitocina (OTRs) foram encontrados em

osteoblastos humanos e também em osteoclastos (COLUCCI et al. 2002; COPLAND et al. 1999; PETERSSON et al. 2002).

Estudos relataram formação óssea por ação de OT em roedores (ELABD et al. 2007; ELABD et al. 2008). Publicação mais recente (TAMMA et al., 2009) relatou OT como hormônio ósseo anabolizante e que a depleção de OTRs causa osteoporose resultante de reduzida formação de massa óssea em camundongos machos e fêmeas. Estes autores inferem que OT estimula a diferenciação dos osteoblastos nas formas mineralizantes e tem dupla ação sobre os osteoclastos, uma estimulando diretamente sua formação e a outra inibindo a reabsorção óssea destas células. Juntos os achados genéticos e farmacológicos indicam OT como regulador anabólico de massa óssea com implicações potenciais para terapia de osteoporose (TAMMA et al., 2009).

Foi confirmado que a osteoblastogênese diminuiu com o avançar da idade (D'IPPOLITO et al., 1999). Esta diminuição é acompanhada por adipogênese aumentada e mielopoese, bem como diminuição de osteoclastogênese, provavelmente em função de redução nas células mesenquimais. Isto sugere que há no envelhecimento, alterações na expressão de genes que favorecem a diferenciação de células mesenquimais multipotentes para adipócitos em detrimento dos osteoblastos (MANALAGAS, 2000). De fato, quando os soros de mulheres na pós-menopausa foi adicionado a células mesenquimais progenitoras de adipócitos e osteoblastos houve diferenciação destas para adipócitos, porém quando OT foi adicionada a estas mesmas células a diferenciação foi para osteoblastos (ELABD et al., 2008) .

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O efeito da atuação da OT no reparo de defeitos ósseos, bem como na prevenção da osteoporose pós-menopausa ainda é limitado e demanda estudos para melhor conhecimento. Em ratas com idades correspondentes à faixa etária de maior incidência de menopausa e pós-menopausa na mulher, dados pertinentes à ação da OT sobre o metabolismo ósseo são desconhecidos. Assim os objetivos propostos foram:

1. Analisar a atuação de ocitocina sobre a remodelação do osso alveolar em ratas com 12, 18 e 24 meses.
2. Analisar e comparar os marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo entre os grupos experimentais.

3- MATERIAL E MÉTODOS

Grupos experimentais:

Foram utilizadas 48 ratas da linhagem Wistar com 12, 18 e 24 meses. Os animais foram divididos em seis grupos com oito animais cada, na seguinte distribuição: 12 meses (controle e tratado), 18 meses (controle e tratado) e 24 meses (controle e tratado). As ratas foram mantidas em gaiolas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz controlada (12/12 h) e com acesso livre à água e ração. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba –FOA-UNESP (2009-005746) (anexo A).

O esfregaço vaginal foi colhido para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã, segundo a técnica de Long E Evans (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico durante 2 semanas. Os animais do grupo de 12 meses que foram submetidos aos experimentos apresentavam ciclo estral regular com as 4 fases (diestro, proestro, estro, metaestro) presentes. As ratas dos grupos de 18 e 24 meses apresentavam-se em diestro pela predominância de leucócitos, caracterizando irregularidade do ciclo estral.

No primeiro dia do experimento, os animais receberam duas injeções intraperitoniais com 12 horas de intervalo. As ratas (tabela 1) dos grupos controle receberam solução fisiológica (SF – 0,15M) e as ratas dos grupos tratados receberam OT (134 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) (TAMMA et al., 2009).

Sete dias após o tratamento com OT ou SF, foi realizada extração do incisivo central superior direito, sob efeito de anestesia com xilazina/quetamina

(xilazine 10mg/Kg ip - Dopaser Laboratories Calier S.A., Barcelona, Spain; quetamina – 80mg/Kg – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brazi), com instrumental apropriado e adaptado por OKAMOTO E RUSSO (1973). Imediatamente após a exodontia, as bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de seda 4-0 (Johnson e Johnson) e os animais receberam dose única de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, Wyeth, São Bernardo do Campo, SP, Brasil – 0,2 mL/rato/i.m.). A alimentação dos animais foi com dieta em pó durante as primeiras 48 horas após as intervenções cirúrgicas, retornando à normalidade após este período. Este procedimento foi executado para a análise do processo de reparo alveolar após 28 dias da extração.

Tabela 1 Distribuição dos grupos e tratamento

Grupos	Idade (meses)	Ratas por grupo	Tratamento (1º dia)	
			2 injeções 12h intervalo	
			grupo	Substância
1	12	8	controle	SF
2	12	8	tratado	OT
3	18	8	controle	SF
4	18	8	tratado	OT
5	24	8	controle	SF
6	24	8	tratado	OT

Aos 35 dias após o tratamento (TAMMA *et al.*, 2009) e 28 dias pós-exodontia (Fig. 1), os animais foram anestesiados novamente com

xilazina/quetamina para coleta sanguínea de veia jugular externa (HARMS & OJEDA, 1974). A primeira coleta de sangue foi realizada para obtenção do soro (1mL de sangue) e em seguida, utilizando seringas, cânulas e tubos heparinizados, foi realizada a coleta sanguínea para obtenção do plasma (3mL de sangue). Parte do material obtido foi acidificada com ácido acético 20% (V/V) na proporção de 1/100 para a determinação de TRAP. Em seguida, os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico para retirada das maxilas (fig. 1).

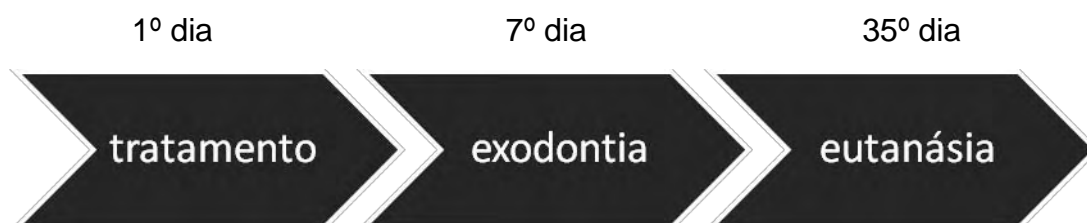


Figura 1 Sequência de eventos

Procedimentos laboratoriais

A separação da maxila direita da esquerda foi realizada por meio de incisão sagital mediana, que acompanha a sutura inter-maxilar para obtenção de peça com o alvéolo direito, após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares. Os alvéolos direitos foram fixados em formalina neutra (10%), durante 24 horas, em temperatura ambiente. Após este período, foram lavados em água corrente, por 24 horas e descalcificados em EDTA (10%), pH 7,0, por período de 45 dias. Após descalcificadas, as peças foram lavadas em água corrente, por 24 horas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina pelo método de rotina, com o cuidado de orientá-las de forma a permitir cortes dos alvéolos, no sentido vestibulo-lingual e paralelamente ao seu longo eixo. Nos blocos obtidos, foram efetuados 10 cortes longitudinais semi-seriados, com

seis micrômetros de espessura. Os cortes 5 e 6, correspondentes às partes mais centrais dos alvéolos foram corados com hematoxilina e eosina para análise histométrica. Os cortes subsequentes (7 e 8) foram submetidos à reação de imunohistoquímica contra OC e TRAP.

Foram realizadas dosagens sanguíneas de cálcio, fósforo, FAL, OC, OPG, TRAP e dosagens hormonais de OT e Estrógeno.

Cálcio

As determinações de cálcio foram realizadas através de método espectrofotométrico (Kit marca Labtest cat. 90). O cálcio reage com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando complexo de cor violeta. A absorvância é determinada em 570 nm.

Fósforo

As determinações de fósforo foram realizadas através do método espectrofotométrico de Daly e Ertingshausen modificado, utilizando kits comerciais, marca Labtest (Cat. 12). O fósforo inorgânico reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de complexo fosfomolibdato não reduzido, que é determinado em 340 nm.

Fosfatase alcalina total

A fosfatase alcalina foi determinada por método de Roy modificado, com o emprego de Kits da marca Labtest (Cat. 40), através de reação de ponto final, utilizando como substrato timolftaleína monofosfato.

Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato - Osteoprotegerina - Osteocalcina

A TRAP, a OC e a OP foram determinadas por técnica quantitativa e imunoenensaio em sanduiche com enzima ligada (ELISA), com kits específicos para ratos da marca Uscn Life Science Inc. (Wuhan, China).

Ocitocina

Foi realizada dosagem de OT através de radioimunoensaio, após extração prévia do plasma com acetona e éter de petróleo, no laboratório de neuroendocrinologia da FMRP/USP de responsabilidade do Prof. Dr. José Antunes Rodrigues.

Estradiol

Foi realizada dosagem da concentração plasmática de estradiol por técnica de radioimunoensaio com o kit para estradiol MP Biomedicals (Costa Mesa, CA – USA).

Análise Histomorfométrica

Para a análise histométrica foi padronizada a mensuração da região do terço médio alveolar (região II da fig. 2) de cada corte. Foram analisados dois cortes por animal e os resultados expressos pela média. Para tabular a área de leitura (terço médio) mediu-se, com um paquímetro, a distância entre os pontos da maior e da menor curvatura palatina. O resultado foi dividido por três para as duas curvaturas e com os pontos obtidos traçaram-se as linhas de delimitação da área a ser analisada (Fig. 2).

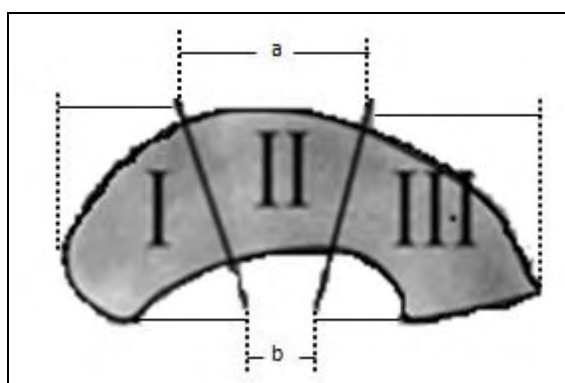


Figura 2 Esquema do alvéolo dividido nos terços apical (I), médio (II) e cervical (III) delimitados por medidas de 1/3 da maior curvatura palatina (a) e 1/3 da menor curvatura palatina (b).

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio de “software ImageLab” (Diracom 3). Para a aquisição de imagens, foi utilizada câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio (Carl Zeiss – Axiolab) e conectada ao computador. As imagens foram capturadas num aumento de 100x (microscópio Carl Zeiss – Axiolab) e transferidas para o “software” (imagemlab – Diracom 3).

Análise imunohistoquímica

Os espécimes experimentais foram os mesmos utilizados para a realização da análise histomorfométrica e o processamento laboratorial idêntico até o momento da obtenção dos cortes com 6 μm de espessura que foram submetidos à reações imunoistoquímicas através do método de detecção pela imunoperoxidase. Os cortes histológicos foram preparados, submetidos à desparafinização, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 30%, recuperação antigênica com solução tampão fosfato citrato e bloqueio da biotina endógena através de leite desnatado. Na sequência, realizou-se o protocolo das incubações, tendo como anticorpos primários: anti-osteocalcina, produzido em cabras (goat anti osteocalcin polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, SC 18319) e anti-trap, produzido em cabras (goat anti trap polyclonal Santa Cruz Biotechnology, SC 30832). O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotinilado anticabras produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). A amplificação do sinal da reação foi realizada utilizando-se o kit Elite Avidina e Biotina (Vector Laboratories) e a diaminobenzidina (Sigma) foi o cromógeno utilizado. Na sequência, os cortes receberam a contra-coloração por hematoxilina de Harris.

A análise das imunomarcações foi realizada com o objetivo de identificar as características da marcação de cada proteína estudada.

Análise Estatística:

Foram utilizadas as médias \pm EPM para apresentação dos resultados de concentração plasmática de cálcio, fósforo, FAL, OPG, OC, TRAP, porcentagem de formação óssea, OT e estrógeno. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas as comparações.

4- DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Análises

Foram realizados ensaios bioquímicos para determinação da concentração sanguínea de cálcio, fósforo, FAL, OPG, OC, TRAP, OT e estrógeno de ratas com 12,18 e 24 meses, tratadas ou não com OT. Os resultados obtidos estão representados pela média e EPM (\pm) nas figuras 3, 4, 5, 6, 14 e 15.

Não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo quando os grupos experimentais foram comparados entre si, demonstrando que tanto a idade como o tratamento não interferiram significativamente nas concentrações destes íons (Fig. 3).

A análise dos resultados obtidos para os marcadores bioquímicos de formação óssea (FAL, OPG e OC), revelou situações distintas em função da idade. Quando foram comparados os animais de 12 meses que receberam OT e os de mesma idade que receberam SF, não se observou diferença significativa das concentrações de nenhuma destas substâncias (Fig. 4). Nos grupos de 18 e 24 meses os resultados destes marcadores foram diferenciados. Os valores obtidos nas determinações de FAL foram significativamente aumentados nos grupos tratados de 18 e 24 meses quando comparados com os controles de mesma idade. Dentre os animais que receberam OT, o grupo de 18 meses apresentou resultados significativamente maiores em relação aos de 12 e 24 meses submetidos ao mesmo tratamento (Fig. 4).

As análises de OPG não denotaram diferença significativa de valores quando foram comparados os grupos controle e tratado de mesma idade. Estas concentrações, no entanto foram significativamente maiores no grupo de 24 meses que recebeu OT em relação aos grupos de 12 e 18 meses submetidos ao mesmo tratamento (Fig.4).

Nos animais de 18 e 24 meses que receberam OT observou-se aumento significativo das concentrações de OC quando os mesmos foram cotejados com os controles de mesma idade. A análise comparativa entre os animais dos grupos controle revelou decréscimo gradativo das concentrações de OC com a idade, resultando em valores significativamente menores nas ratas de 24 meses em relação às demais (Fig. 4).

A exemplo do que se observou com os marcadores de formação óssea, a análise dos resultados obtidos para o marcador bioquímico de reabsorção (TRAP) não revelou diferença significativa na comparação entre os animais de 12 meses tratados com OT e os respectivos controles. Esta diferença também não foi observada nos grupos de 18 meses. Já no grupo de 24 meses, nos animais controle, a determinação da atividade da TRAP evidenciou aumento significativo quando comparado aos grupos com animais de 12 e 18 meses (Fig. 5). Além disso, a administração de OT nos animais com 24 meses resultou em diminuição estatisticamente significante da atividade da TRAP em comparação com os que receberam solução fisiológica (Fig. 5).

A histomorfometria foi realizada no terço médio alveolar, conforme ilustrados nas figuras 6 e 7. Esta análise confirmou os resultados dos marcadores bioquímicos de formação óssea e não revelou diferença significativa de porcentagem de formação óssea na comparação entre o grupo

tratado e o grupo controle de 12 meses (Fig. 6). Os alvéolos dentais estavam recobertos por tecido epitelial associado a tecido conjuntivo rico em fibroblastos, com moderada quantidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos. A ferida cirúrgica estava preenchida em sua totalidade por espessas trabéculas ósseas neoformadas entremeadas por tecido conjuntivo frouxo, rico em fibroblastos e vascularizado. Nos grupos de 18 e 24 meses, o tratamento com OT promoveu formação óssea, cujos valores equivaleram aos de 12 meses. O cotejo entre as porcentagens de formação óssea dos animais de 18 e 24 meses que receberam OT e os respectivos controles, detectou valores significativamente maiores nos animais tratados (Fig.6). Estes dados equivaleram aos observados histologicamente (Fig.7). Nos grupos de 18 e 24 meses, houve menor formação óssea nos grupos controles em comparação com os tratados. Nos controles destas idades havia áreas maiores de osso trabeculado fino e tecido conectivo que nos animais que receberam OT. Nestes, houve maior área de formação óssea ocupando a maior parte do interior dos alvéolos e o osso trabecular era mais compacto, isto é, com maior fusão entre as trabéculas quando comparados com os respectivos controles (Fig.7)

As reações de imunohistoquímica contra OC e TRAP foram realizadas nos cortes com a finalidade de identificar as respostas celulares durante o reparo alveolar ósseo. Nos grupos de 12 meses, os resultados obtidos não denotaram diferença das imunomarcações para osteocalcina entre o grupo controle (Fig. 8 A e C) e o grupo tratado (Fig. 8 B e D). Para TRAP os resultados dos animais de 12 meses também foram equivalentes entre o grupo controle (Fig. 9 A e C) e o grupo tratado (Fig. 9 B e D). Estes resultados

confirmam os dados dos marcadores bioquímicos e da formação óssea alveolar. Nos grupos de 18 meses pode-se observar presença diminuída de imunomarcação para osteocalcina nos animais do grupo controle (Fig. 10 A e C) em relação ao tratado (Fig. 10 B e D). Para TRAP esta relação foi invertida observando-se diminuição na quantidade de osteoclastos no grupo tratado (Fig. 11 B e D) em relação ao controle (fig.11 A e C).

Nos animais de 24 meses a reação de osteocalcina demonstrou decréscimo significativo desta proteína em osteoblastos e na matriz mineralizada no grupo controle (Fig. 12 A e C) em relação ao tratado (Fig. 12 B e D). Nesta idade, observou-se no grupo que recebeu OT marcação mais acentuada mostrando que nestes (Fig. 12 B e D) o osso apresentou melhor condição de mineralização quando comparado com o grupo controle (Fig 12 A e C). Na reação para TRAP efetuada nos animais de 24 meses, houve grande quantidade de osteoclastos com imunomarcação positiva no grupo controle (Fig. 13 A e C), mostrando intensa atividade de reabsorção óssea nestes animais. No grupo tratado (Fig. 13 B e D) houve importante decréscimo na expressão de células com marcação positiva para TRAP, mostrando evidência de menor atividade reabsortiva nestes animais. Estes resultados foram compatíveis com os obtidos através dos marcadores de formação e reabsorção óssea e com a análise de formação óssea durante o reparo alveolar.

Os resultados da determinação da concentração plasmática de OT foram muito variáveis dentre os animais de mesmo grupo, no entanto, os valores médios evidenciaram resultados semelhantes nos grupos de animais com 12 e 18 meses, tratados ou não com OT (Fig. 14). Nos grupos de 24 meses a observação destes valores médios denotou aumento significativo na

concentração plasmática de OT nos animais que receberam há 35 dias, duas injeções intraperitoniais da solução fisiológica ou do hormônio, quando comparados com o respectivos controles e com os animais com 12 e 18 meses que receberam o mesmo tratamento (Fig. 14).

As dosagens de estrógeno não diferiram entre os grupos, exceto o grupo controle de 12 meses que apresentou as maiores concentrações em relação aos demais (Fig. 15).

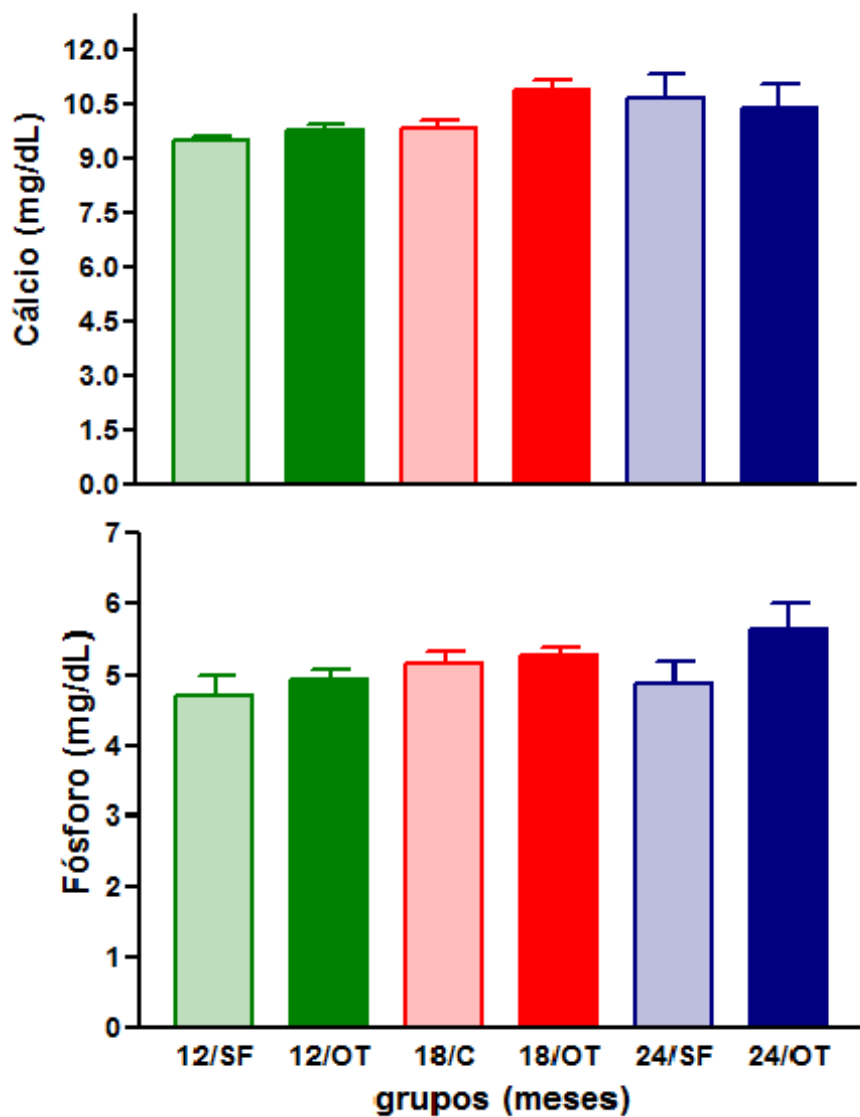


Figura 3 Concentração plasmática de cálcio e fósforo de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos.

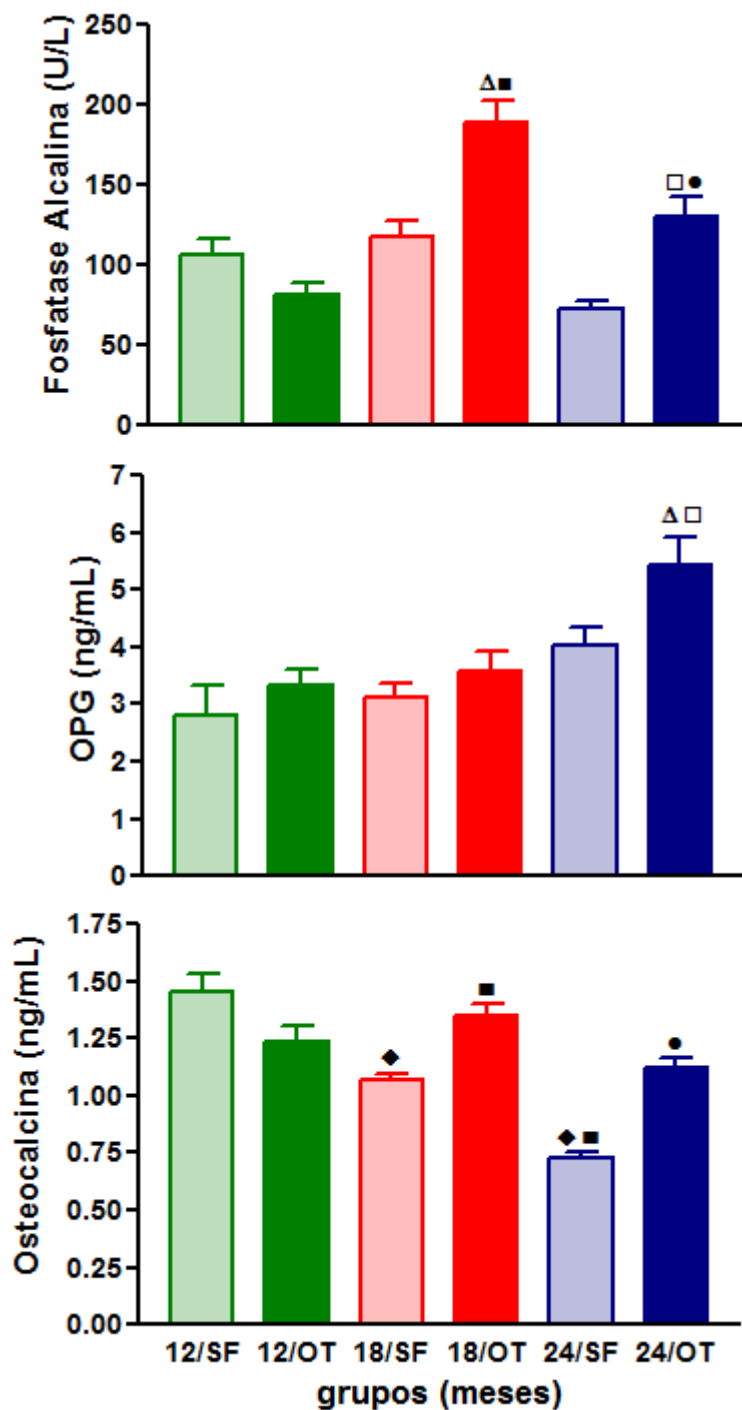


Figura 4 Concentração plasmática dos marcadores bioquímicos de formação óssea (FAL, OPG e OC) de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. *P< 0,05 vs 12/SF; ^ΔP<0,05 vs 12/OT; [□]P< 0,05 vs 18/OT [◆]P< 0,05 vs 18/SF; [●] P< 0,05 vs 24/SF.

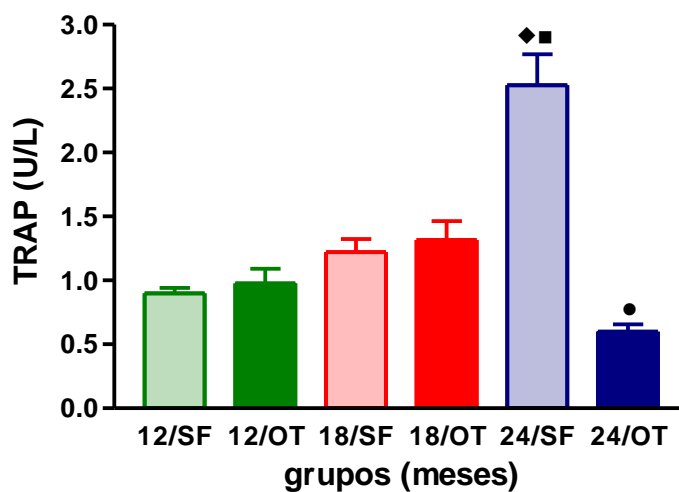


Figura 5 Determinação sérica de TRAP de ratas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. *P< 0,05 vs 12/SF; †P< 0,05 vs 18/SF; ° P< 0,05 vs 24/SF.

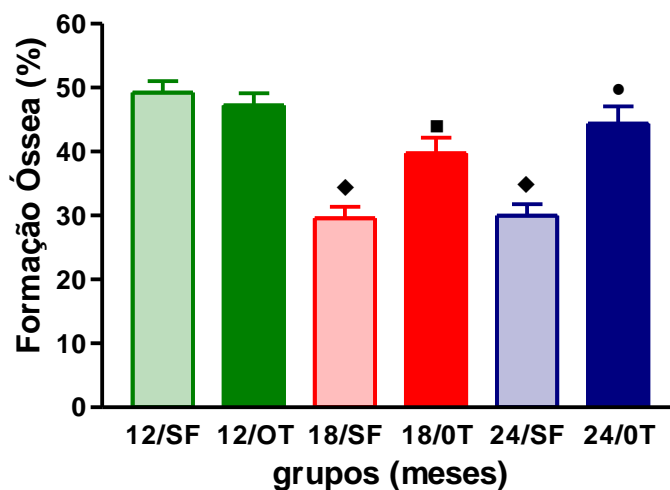


Figura 6 Formação óssea no terço médio do alvéolo de ratas intactas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. *P< 0,05 vs 12/SF; †P< 0,05 vs 18/SF; ° P< 0,05 vs 24/SF.

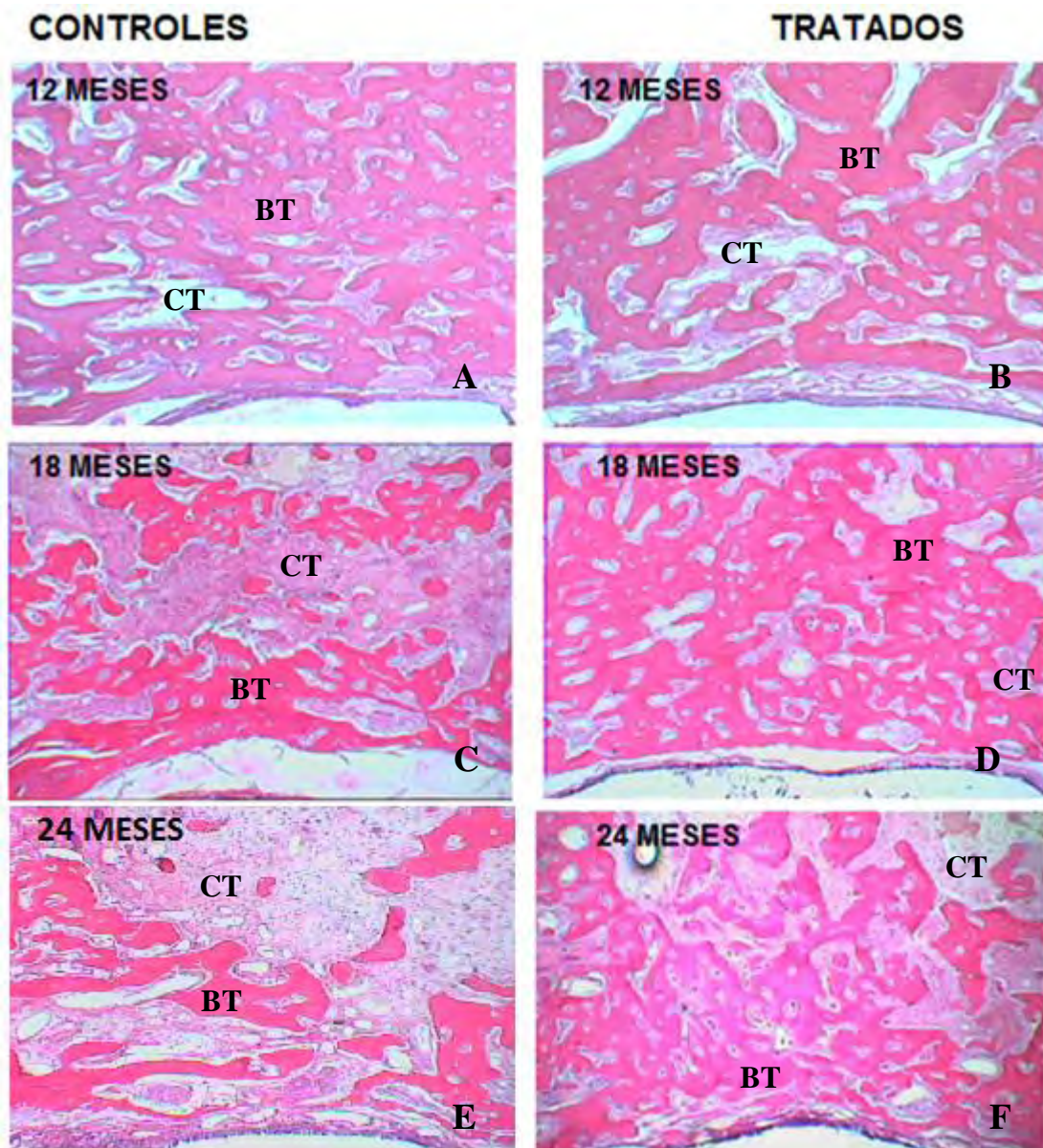


Figura 7 Terço médio alveolar de ratas dos grupos: controle 12 meses (A), tratado 12 meses (B), controle 18 meses (C), tratado 18 meses (D), controle 24 meses (E) e tratado 24 meses (F), 28 dias após exodontia (35 dias após OT-animais tratados e SF- animais controles). Notar o osso trabecular neoformado (BT) e o tecido conectivo (CT). Cortes histológicos com 6 μ m. Hematoxilina e eosina 100x.

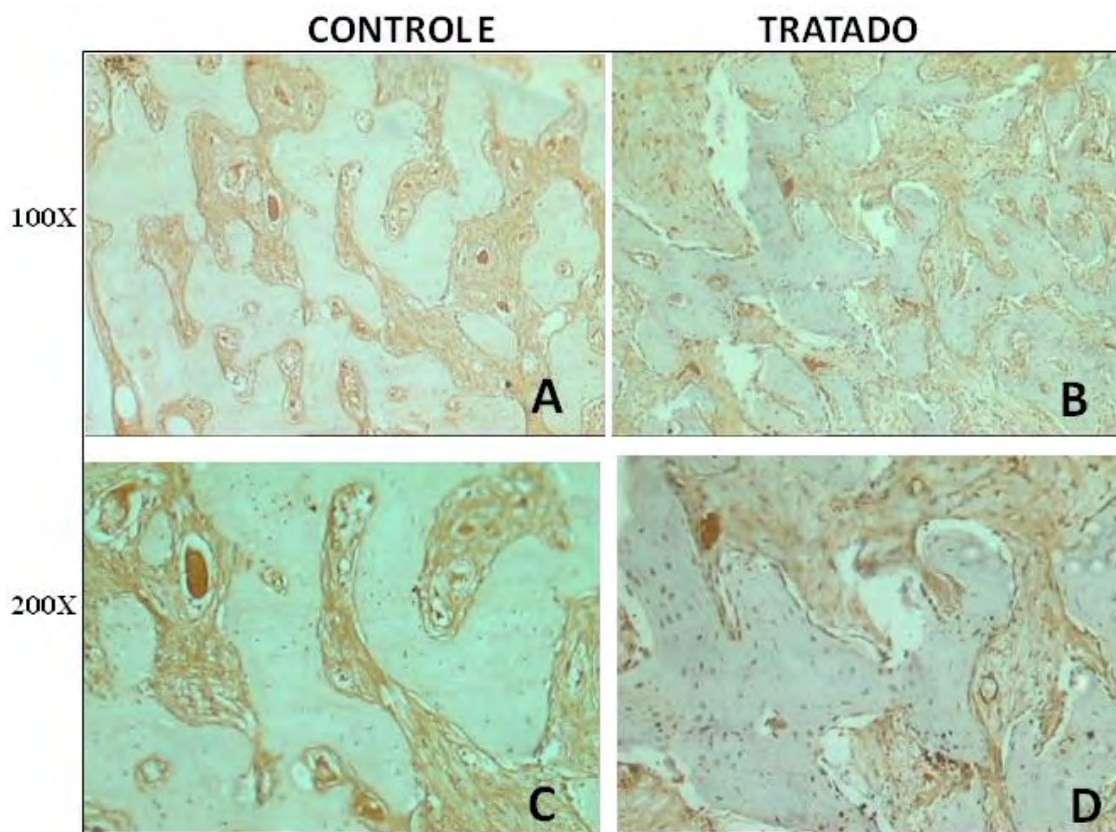


Figura 8 Cortes histológicas (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 12 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT- tratados ou SF- controles) mostrando imunomarcção para osteocalcina. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) a imunomarcção não difere do grupo tratado (B-100x e D-200x), mostrando que o processo de mineralização não diferiu entre os grupos quando se considera este marcador.

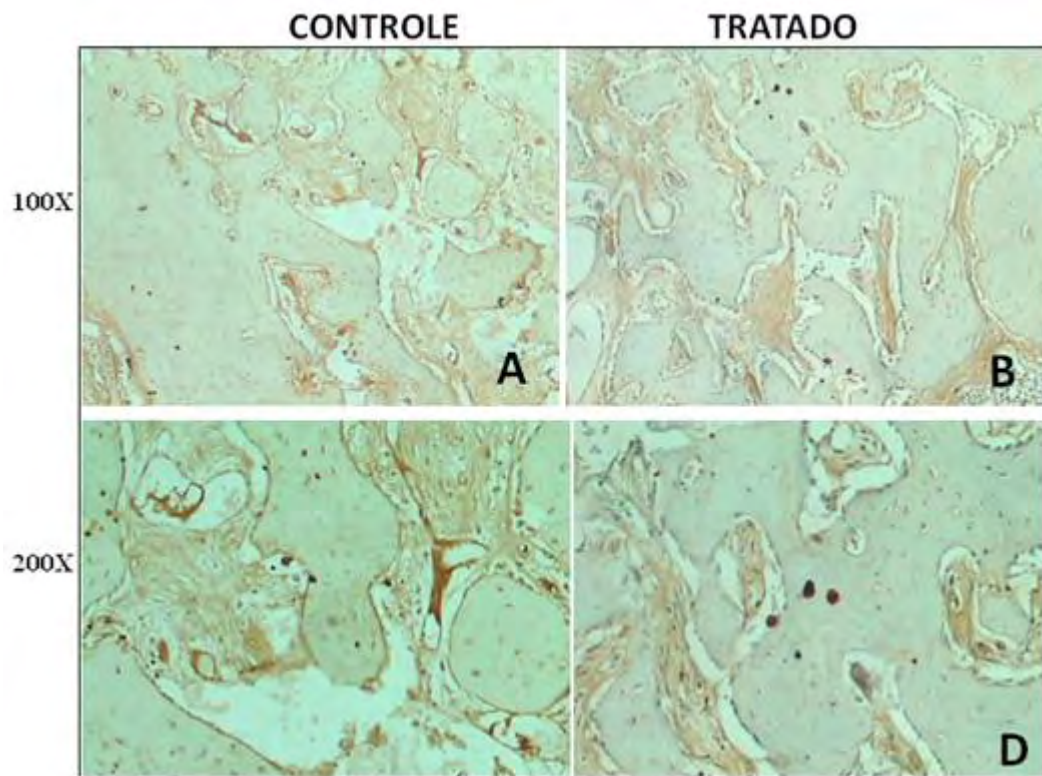


Figura 9 Cortes histológicos (6 μm) do terço médio alveolar de ratas de 12 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT- tratados ou SF-controles) mostrando imunomarcção para TRAP. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) o número de osteoclastos marcados é semelhante ao número do grupo tratado (B-100x e D-200x), mostrando que o processo de reabsorção não diferiu entre os grupos quando se considera este marcador.

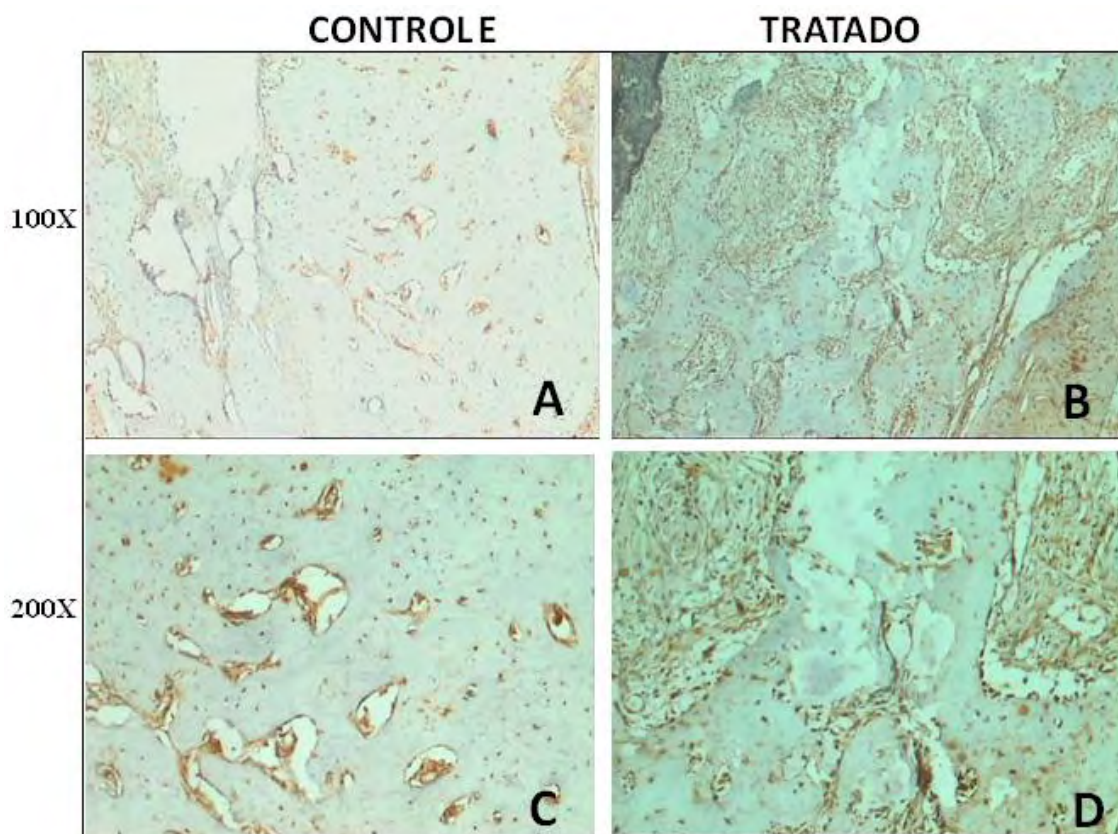


Figura 10 Cortes histológicos (6 μm) do terço médio alveolar de ratas de 18 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT- tratados ou SF- controles) mostrando imunomarcção para osteocalcina. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) a imunomarcção é discreta e inferior ao grupo tratado (B-100x e D-200x), mostrando maior processo de mineralização do grupo tratado. Osteoblastos são positivos para esta proteína.

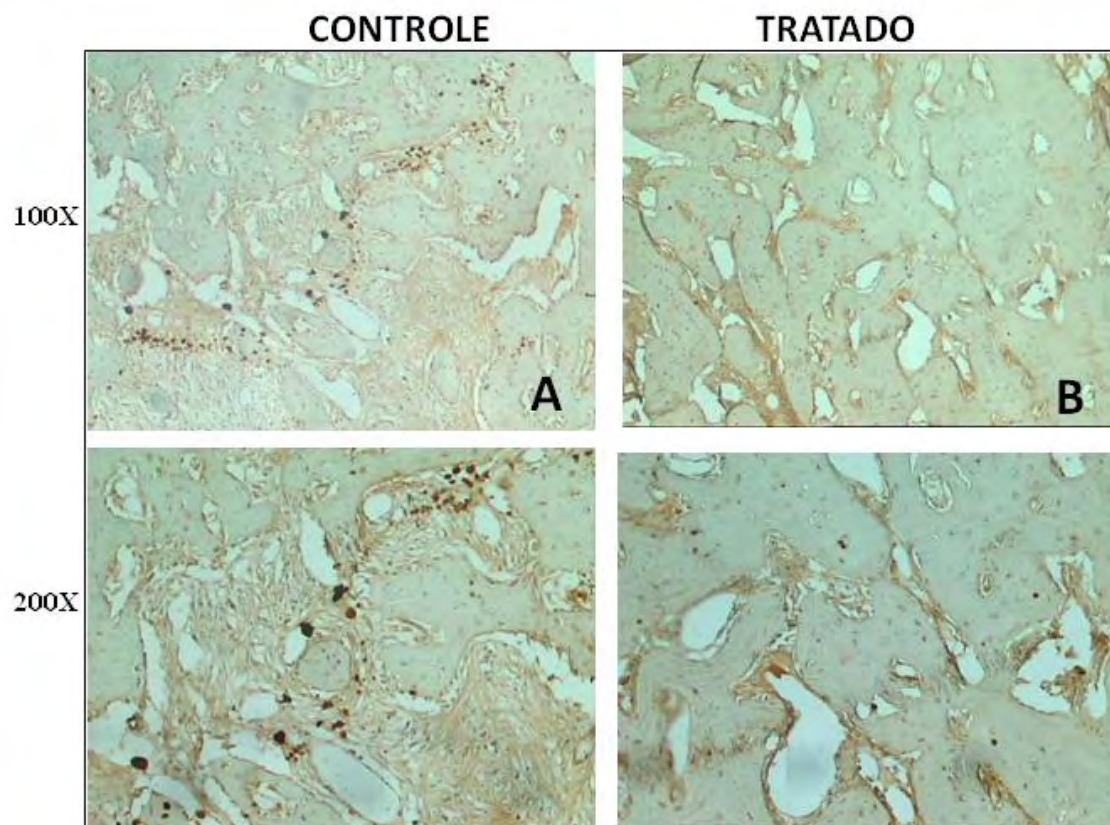


Figura 11 Cortes histológicas (6 μ m) do terço médio alveolar de ratas de 18 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT-tratados ou SF-controles), mostrando a imunomarcação para TRAP. Notar que nos controles (A-100x e C-200x) há aumento no número de osteoclastos representando processo de reabsorção mais intenso em relação aos animais do grupo tratado (Bx100 e Dx200)

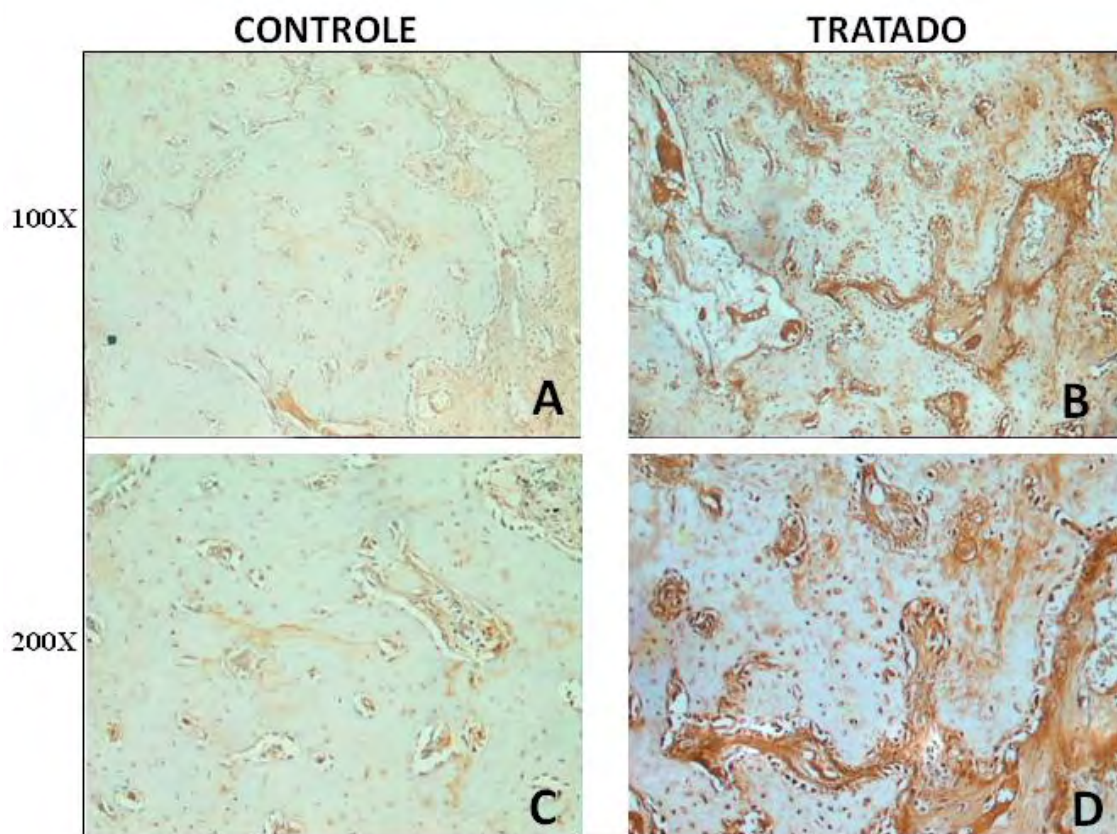


Figura 12 Cortes histológicos (6 μm) do terço médio alveolar de ratas de 24 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT- tratados ou SF- controles) mostrando imunomarcção para osteocalcina. Notar que no grupo controle (A-100x e C-200x) quase não se observa imunomarcção enquanto no grupo tratado (B-100x e D-200x) quantidade bem maior desta proteína é observada, mostrando que no grupo tratado houve aumento de marcação desta proteína na matriz mineralizada e nos osteoblastos indicando maior processo de mineralização nestes animais.

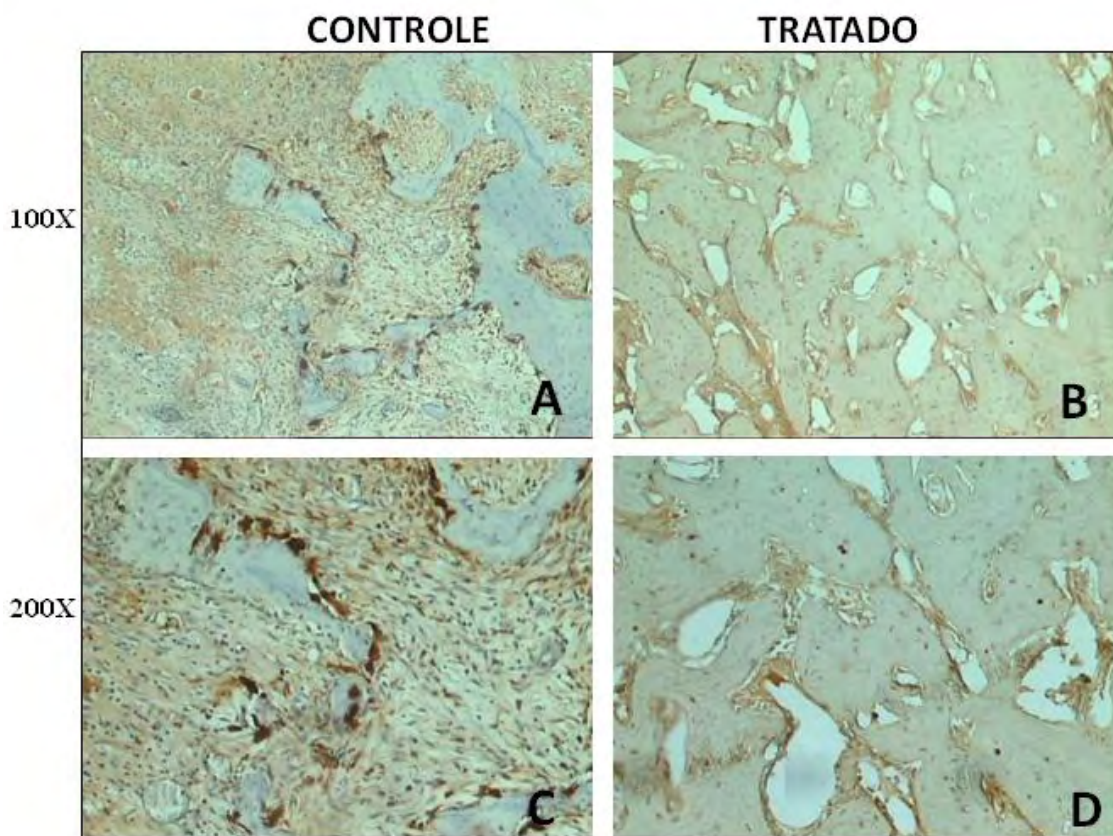


Figura 13 Cortes histológicos (6 μm) do terço médio alveolar de ratas de 24 meses, 28 dias após exodontia (35 dias após aplicação de OT- tratados ou SF- controles) mostrando imunomarcção para TRAP. Notar no grupo controle (A-100x e C-200x) grande número de osteoclastos com marcação positiva para TRAP é observado, representando intensa atividade de reabsorção óssea. No grupo tratado (B-100x e D-200x) o número de osteoclastos marcados é menor e praticamente ausente nas proximidades do osso trabecular, indicando atividade reabsortiva reduzida em relação ao grupo controle.

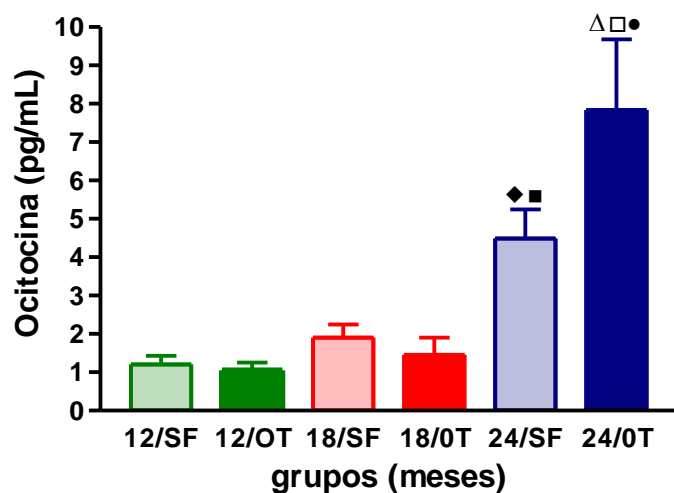


Figura 14 Determinação plasmática de ocitocina de ratas intactas com 12, 18 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N= 8 animais/grupos. [†] P< 0,05 vs 12/SF; [▪] P< 0,05 vs 18/SF; ^ΔP<0,05 vs 12/OT; [◻]P< 0,05 vs 18/OT; [•] P< 0,05vs 24/SF

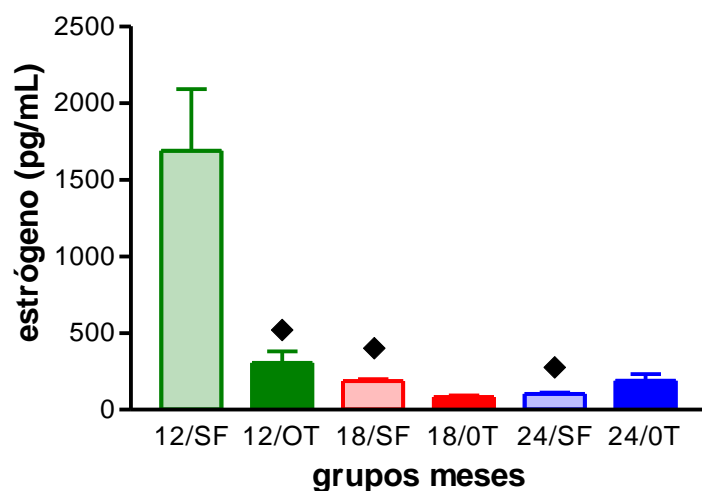


Figura15 Determinação plasmática de estrógeno de ratas com 12, 18 e 24 meses que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT). N = 8 animais/grupo. [†]P< 0,05 vs 12/SF

5- DISCUSSÃO

No presente estudo pode-se verificar que a administração de OT favoreceu a formação óssea e inibiu a reabsorção nos animais com idade mais avançada.

A concentração intra e extracelular dos íons minerais cálcio, magnésio e fosfato é necessária tanto para o metabolismo sistêmico como para a formação e mineralização óssea (FAVUS et al., 2006). Os resultados obtidos não revelaram diferenças estatisticamente significantes nos valores de cálcio e fósforo séricos quando os grupos foram comparados entre si, demonstrando que o tratamento não alterou a homeostasia mineral destes íons.

Na análise conjunta dos resultados dos marcadores de formação óssea, FAL e OC entre animais de mesma idade tratados ou não com OT não houve diferença significativa de valores quando comparados entre si os grupos controle e tratado de 12 meses, mostrando que, nesta idade, o tratamento com OT não desencadeou alterações significativas destes marcadores. Entretanto, nos grupos de 18 e 24 meses as concentrações foram significativamente maiores tanto para FAL quanto para OC nos animais que receberam OT em relação aos respectivos controles. Provavelmente, nestas idades, a OT estimula na fase de formação óssea do ciclo de remodelamento, a atividade enzimática da FAL que, controlando os inibidores da mineralização, remove o fosfato de outras proteínas e/ou possivelmente atua como transportador iônico resultando em maior capacidade de mineralização dos osteoblastos (USTÁRIZ et al., 1998). A osteocalcina se relaciona à qualidade óssea e sua habilidade para resistir à fratura. Verificamos que o tratamento com OT desencadeou aumento na concentração plasmática de OC nos animais com 18 e 24 meses,

possivelmente devida ação dos osteoblastos maduros, os quais secretam OC e determinam o processo de mineralização (ROBEY; BOSKEY, 2003). O decréscimo das células mesenquimais progenitoras relacionadas à idade, bem como o aumento de produtos oriundos de glicação não enzimática decorrentes do envelhecimento, podem estar relacionados aos fatores que contribuíram para a diminuição das concentrações de OC nos animais dos grupos controles de 18 e 24 meses. Estudo de Di Dio (1994) demonstrou que a OC, que contém três resíduos do ácido gama-carboxiglutâmico (GLA) incorporada à matriz óssea não contribui para seus níveis normais. Cerca de 3 horas após o bloqueio dos resíduos GLA toda a OC incorporada ao osso permanecia saturada pelos resíduos de GLA, enquanto que toda a OC circulante estava desprovida dos resíduos ácidos. Assim, ficou evidente que as concentrações periféricas da OC refletem a atividade osteoblástica recente, quase instantânea. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo indicam que OT promoveu atividade osteoblástica maior nos animais de 18 e 24 meses e sugerem formação óssea maior por ação de OT nestes grupos em relação aos respectivos controles.

A abordagem imunohistoquímica permite preservação da citoarquitetura tecidual, que é aspecto importante a considerar quando o processo de cicatrização alveolar é avaliada (LUVIZUTO et al., 2010, 2011). De fato, nos animais de 12 meses a imunomarcagem para OC realizada no alvéolo não diferiu entre os grupos, mas mostrou decréscimo desta proteína em osteoblastos e na matriz mineralizada dos grupos controle de 18 e 24 meses quando comparados com os equivalentes tratados. Nos animais destas idades (18 e 24 meses) que receberam OT houve maior marcação desta proteína

mostrando que o osso apresentou melhor condição de mineralização em relação aos grupos controles. Estes resultados foram condizentes com os marcadores bioquímicos plasmáticos FAL e OC.

Ainda como marcador local fidedigno na detecção de formação óssea, os resultados de histomorfometria, ratificaram estas análises e evidenciaram a ação anabólica da OT nos grupos de 18 e 24 meses. Os resultados deste parâmetro detectaram aumento significativo de formação óssea nos grupos de 18 e 24 meses que receberam OT em relação aos respectivos controles. Observa-se que nestes animais houve formação óssea equivalente aos de 12 meses, idade considerada limítrofe para remodelação óssea alta em ratos (ERBEN, 1996). Em estudo com fêmeas da linhagem Wistar, constatou-se que o crescimento ósseo foi maior entre 1 e 3 meses de idade, diminuiu entre 3 e 6 meses e alcançou níveis patamares com 12 meses (KALU et al., 1989). Realmente, nos controles de 18 e 24 meses a formação óssea foi significativamente menor quando comparados aos de 12 meses. A injeção de OT, porém tornou estes valores equivalentes.

Além da formação óssea mais baixa, o cotejo entre os grupos controle de diferentes idades denotou aumento significativo do marcador de reabsorção (TRAP) nos animais de 24 meses, indicando que a reabsorção aumentou com o envelhecimento, uma vez que a TRAP de origem osteoclástica é presumivelmente liberada na circulação durante a reabsorção óssea (AZRIA, 1989; CHRISTENSON, 1997). Entretanto, quando os animais foram tratados com OT a atividade de TRAP reduziu de forma estatisticamente significativa apenas no grupo de 24 meses, sugerindo que além de favorecer a formação óssea, OT inibiu a reabsorção nos animais desta idade.

Como marcador local, a análise imunohistoquímica contra TRAP não revelou diferença entre os animais dos grupos controle e tratado de 12 meses confirmando os resultados obtidos com a dosagem sanguínea. Entretanto, demonstrou maior quantidade de osteoclastos com marcação positiva para este enzima nos grupos controles de 18 e 24 meses, quando comparados com os respectivos tratados, nos quais houve diminuição importante da expressão de células com a marcação positiva para TRAP. Estes dados indicam ação anti-reabsortiva de OT nestas idades.

A mineralização promovida por OT é condizente com as ações anabólicas relatadas para este hormônio em ratos (ELABD et al., 2007; ELABD et al., 2008) e camundongos (TAMMA et al., 2009). Em ratos machos adultos (150-200g de peso corporal), a injeção de OT intramuscular promoveu formação óssea (ELABD et al., 2007; ELABD, 2008). A supressão de OT ou de seus receptores em camundongos machos e fêmeas provocou redução da formação óssea e sugeriu que a OT é indispensável para a homeostase do esqueleto em ambos os sexos. Além disso, injeção subcutânea de OT reverteu a perda óssea e reduziu a adiposidade medular em ratas ovariectomizadas há 8 semanas (TAMMA et al., 2009), modulou negativamente a adipogênese e promoveu osteogênese tanto em células multipotentes de tecido adiposo (hMADS) quanto em células mesenquimais da medula óssea (ELABD et al., 2008).

A mineralização promovida pela administração de OT nos animais de 18 e 24 meses pode ser explicada pela interação do hormônio com seus receptores, uma vez que OTRs foram descritos em osteoblastos (COPLAND et al., 1999). Esta interação resultaria possivelmente em eventos intracelulares

como os já descritos para ligação OT-OTR em outras células (COPLAND et al., 1999; SOLOFF et al., 2000; ZINGG; LAPORTE, 2003). Nestas circunstâncias ocorre liberação cálcio intracelular e síntese de prostaglandina E_2 com consequente balanço ósseo positivo (JEE; MA, 1997; ZINGG; LAPORTE, 2003). Nos animais de 12 meses estes efeitos anabólicos de OT não foram observados possivelmente pelo fato de que, nesta idade, os valores de formação óssea são patamares e os animais não se encontravam osteopênicos, ou seja, havia equilíbrio entre formação e reabsorção óssea que é fator determinante no controle do remodelamento (RAISZ, 2005). Estes achados podem sugerir estudos sobre mecanismos que controlem a ação de OT em animais com equilíbrio entre taxas de formação e de reabsorção.

Os resultados de OPG não revelaram alterações significativas exceto quando os grupos tratados foram comparados entre si. Nesta circunstância os valores de OPG foram significativamente maiores no grupo de animais com 24 meses em relação aos grupos de 12 e 18 meses. A interação da OPG, com RANK-L presente na superfície de osteoblastos precursores resulta em apoptose de osteoclastos (KWAN et al., 2004). Desta forma, valores de OPG aumentados podem estar relacionados tanto à maior atividade dos osteoblastos que a produzem como à baixa reabsorção óssea em função de menor atividade osteoclástica. Os resultados demonstram que o tratamento com OT promoveu aumento nos valores de OPG no grupo de 24 meses em relação aos demais. Comparando-se estes resultados com os parâmetros de formação óssea (FAL, OC, imunohistoquímica contra OC e histomorfometria) observa-se correspondência. Por outro lado, se a comparação das concentrações aumentadas de OPG nos animais de 24 meses que receberam

OT for realizada com o marcador de reabsorção (TRAP) observa-se relação inversa compatível. Com concentrações maiores de OPG, maior quantidade desta está ligada a RANK-L favorecendo a apoptose osteoclástica e consequentemente os valores de TRAP tendem a ser menores. A atividade de TRAP reflete mais o número do que a atividade dos osteoclastos (DELMAS et al., 2000).

Desta forma, os resultados obtidos evidenciam ação de OT sobre osteoblastos e osteoclastos e são condizentes com os relatos de Tamma e colaboradores (2009). Estes autores sugerem que a OT estimula a diferenciação dos osteoblastos para fenótipo mineralizante e exerce ação dual sobre os osteoclastos favorecendo sua formação e inibindo a reabsorção óssea pelos osteoclastos maduros. De fato, foi demonstrada a presença de OTR em osteoclastos e pré-osteoclastos (COLUCCI et al., 2002). Foi também demonstrado que estes receptores são funcionais e que OT pode afetar a osteoclastogênese aumentando o número de osteoclastos (COLUCCI et al., 2002; TAMMA et al., 2009).

Em paralelo com os relatos de Elabd e colaboradores (2008) de que a concentração plasmática de OT em mulheres na pós menopausa é significativamente menor nas osteoporóticas do que nas saudáveis, nas ratas de 24 meses as concentrações de OT foram maiores nos animais tratados com OT e com maior formação óssea do que nos respectivos controles. Roedores ovariectomizados com mudanças na remodelação óssea e consequente osteopenia, têm significativa diminuição da concentração de OT quando comparado com os controles (TAMMA et al., 2009). Os resultados obtidos para as análises de OT também são condizentes com os trabalhos de Breuil e

colaboradores (2011) que em estudos com mulheres pós menopausadas normais e osteoporóticas concluíram que os baixas concentrações séricas de OT pareceu estar associado com osteoporose severa, independentemente dos fatores associados com osteoporose, tais como estradiol ou leptina, reforçando o conceito de que OT pode estar envolvida na patofisiologia da osteoporose pós-menopausa. Realmente, as concentrações plasmáticas de estrógeno, não diferiram entre os grupos, exceto nos animais do grupo controle de 12 meses, cujos valores foram significativamente maiores que os demais grupos. Isto pode ser explicado pelo fato de que estes animais se encontravam em ciclo estral regular e conseqüentemente com variações dos valores deste hormônio (COMPSTON, 2001).

A análise conjunta dos marcadores de formação óssea (sistêmicos = FAL, OC; locais = imunohistoquímica contra OC e histomorfometria) e de reabsorção (sistêmico = TRAP; local = imunohistoquímica contra TRAP) sugere que OT estimula a atividade dos osteoblastos e a formação óssea principalmente em animais de 18 e 24 meses, bem como inibe a reabsorção nestes animais de idade mais avançada.

Há que se ressaltar que este estudo focaliza ação periférica de OT. Embora os maiores sítios de expressão do gene de OT ocorram no sistema nervoso central, este hormônio é também sintetizado nos tecidos periféricos como útero, placenta, corpo lúteo, testículos e coração (WAHL RU, 2004). OT produzida nestes locais exerce efeito periférico já que este neuropeptídeo não atravessa a barreira hemato-encefálica (CAMERINO, 2008; DICKSON, 2003).

Levando-se em conta o fato de que as concentrações de OC no soro são relativamente bem correlacionadas com o aumento da densidade óssea durante o tratamento de osteoporose com drogas anabolizantes (PRAKASH & BEHARI, 2009) e que concentrações maiores de OC acompanharam os valores aumentados de OT nas ratas de 24 meses tratadas com o hormônio, este estudo reforça afirmações anteriores (ELABD et al., 2007; ELABD et al., 2008 e TAMMA et al., 2009) de que OT poderia ser sugerida como terapia anabólica promissora para osteoporose.

Esta assertiva poderia ser justificada com as seguintes observações obtidas neste estudo:

- as concentrações de cálcio e fósforo não se alteraram com o tratamento indicando manutenção da homeostasia destes minerais;
- nas ratas de 12 meses com ciclo estral regular, não houve alteração na remodelação alveolar e nos marcadores de atividade celular relacionados à formação e à reabsorção ósseas 35 dias após injeção de OT;
- a aplicação de OT em ratas intactas na estropausa (18 e 24 meses) estimulou a atividade osteoblástica e resultou em formação óssea maior, sugerindo ação anabólica do hormônio em organismos senis;
- nos animais com 18 e 24 meses, a OT reduziu significativamente a marcação para TRAP, sugerindo que além de favorecer a formação óssea, este hormônio inibe a reabsorção nos animais com idade mais avançada.

Desta forma, o conjunto de resultados obtidos sugere ação anabólica e anti-reabsorvida de OT no metabolismo ósseo de ratas com idade avançada.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.J. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. **Vet. Clin. Pathol.**, v.32, n.3, p.101-113, 2003.

AL-SHOUMER, K.A.S.; VASANTHY, B.A.; AL-ZAID, M.M. Effects of treatment of hyperthyroidism on glucose homeostasis, insulin secretion, and markers of bone turnover. **Endocr. Pract.**, v.12,n.2, p.121-130, 2006.

AZRIA, M. The value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. **Calcif. Tissue Int.**, v. 45, n. 1, p. 7-11, 1989.

BANDEIRA, F.; CARVALHO, E.F. Prevalência de osteoporose e fraturas vertebrais em mulheres na pós-menopausa atendidas em serviços de referência. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.10, n.1, p.86-98, 2007.

BARON, R.; TROSS, R.; VIGNERY, A. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology, dynamic histomorphometry, and changes during skeletal maturation. **Anat. Rec.**, v.208, n.1, p.137-145, 1984.

BAILEY, A.J.; PAUL, R.G.; KNOTT, L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. **Mech. Ageing Dev.**, v. 106, n. 112, p.1–56, 1998

BINKLEY, N.; KIMMEL, D.B. Effect of age and parity on skeletal response to ovariectomy in rats. **J. Bone Miner. Res.**, v.9, suppl. 1, p.5197, 1994.

BOONEN, S.; HAENTJENS, P.; VANDENPUT, L.; VANDERSCHUEREN, D. Preventing osteoporotic fractures with antiresorptive therapy: implications of microarchitectural changes. **J. Intern. Med.**, v.255, n,1, p.1-12, 2004.

BREUIL, V.; AMRIC, E.; FERRARI, P. P.; TESTA, J.; ELABD, C.; SABONNADIÈRE, C. A.; ROUX, C. H.; AILHAUD, G.; DANI, C.; CARLE, G. F.; ZIEGLER, L. E. Oxytocin and bone remodelling: Relationships with

neurohypothalamic hormones, bone status and body COMPOSITION. **Joint Bone Spine**, V. 78, N.6, P.611-615, 2011

CAMERINO, C. Oxytocin inhibits bone formation through the activation of the sympathetic tone: A new candidate in the central regulation of bone formation. **J Bone Miner Res.**, v. 23, p. 556, 2008.

COLEMAN, R.E. The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. **Cancer**, v.94, n. 10, p.2521-2533, 2002.

COLUCCI, S.; COLAIANNI, G.; MORI, G.; GRANO, M.; ZALLONE, A. Human osteoclasts express oxytocin receptor. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v.297, p. 442-445, 2002.

COMPSTON, J.E. Sex steroids and bone. **Physiol. Rev.**, v.81, n. 1, p. 419-447, 2001.

COPLAND, J.A.; IVES, K.L.; SIMMONS, D.J.; SOLOFF, M.S. Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. **Endocrinology**. v.140, n.9, p. 4371-4374, 1999.

CHRISTENSON, R.H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. **Clin.Biochem.**, v. 30, n.8, p. 573-593, 1997.

DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A.; TUCK, S.P.; VARANASI, S.S. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v.61, n.5, p.577-587, 2008.

DELMAS, P.D.; EASTELL, R.; GARNERO, P.; SEIBEL, M.J.; STEPARN, I. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. **Osteoporos Int.**, v.11, suppl. 6, p.52-517, 2000.

DELMAS, P.D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet.**, v.359, n. 9322, p.2018-2026, 2002.

DICKSON, I.R. Bone. In: ROYCE, P.; STEINMANN, B. **Connective tissue and its heritable disorders**. New York: Wiley-Liss. p. 249-285, 1993.

DI DIO, R. Osteocalcina. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 40, n. 3, p.225-227, 1994.

D'IPPOLITO, G.; SCHILLER, P.C.; RICORDI, C.; ROOS, B. A.; HOWARD, G.A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. **J Bone Miner Res.**, v.14, n.7, p. 1115–1122, 1999.

DURSUN, P.; YUCE, K.; GUNALP, S.; AYHAN, A. Oxytocin and osteoporosis: is there any relationship? **Med. Hypotheses.**, v.64, n.5, p.1060-1061, 2005.

ELABD, S.K.; SABRY, I.; HASSAN, W.B.; NOUR, H.; ZAKY, K. Possible neuroendocrine role for oxytocin in bone remodeling. **Endocr. Regul.**, v.41, n.4, p.131–141, 2007.

ELABD, C.; BASILLAIS, A.; BEAUPIED, H.; BREUIL, V.; WAGNER, N.; SCHEIDELER, M.; ZARAGOSI, L.E.; MASSIÉRA, F.; LEMICHEZ, E.; TRAJANOSKI, Z.; CARLE, G.; EULLER-ZIEGLER, L.; AILHAUD, G.; BENHAMOU, C.L.; DANI, C.; AMRI, E.Z. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. **Stem Cells**. v. 26, p.2399-2407, 2008.

ERBEN, R.G. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? **Anat. Rec.**, v.246,n.1, p.39-46, 1996.

FAVUS, M.J.; BUSHINSKY, D.A.; LEMANN, J.J. Regulation of calcium, magnesium, and disorders of mineral metabolism. In: FAVUS, M.J. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Washington DC: The American Society for Bone and Mineral Research, p.76-83, 2006.

FITZPATRICK, L. A. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 4, p.705-719, 2006.

FREEMANTLE, N.; COOPER, C.; ROUX, C.; DÍEZ-PÉREZ, A.; GUILLEMIN, F.; JONSSON, B.; ORTOLANI, S.; PFEILSCHIFTER, J.; HORNE, R.; KAKAD, S.; SHEPHERD, S.; MÖLLER, G.; MARCINIAK, A.; MARTINEZ, L. Baseline observations from the Possible EU[®] study: characteristics of postmenopausal women receiving bone loss medications. **Arch. Osteoporos.**, v. 5, n. 1/2, p.61-72, 2010.

FULLER, K.; GALLAGHER, A.C.; CHAMBERS, T.J. Osteoclast resorption: stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 181, n. 1, p. 67-73, 1991.

GALI, J.C. Osteoporose. **Acta Ortop. Bras.**, v. 9, n. 2, p. 53-62, 2001.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The oxytocin receptor system: structure, function and regulation. **Physiol. Rev.**, v.81,n.2, p.629–683, 2001.

GUNDBERG, C.M.; ANDERSON, M., DICKSON, I.; GALLOP, P. M. Glycated" osteocalcin in human and bovine bone. The effect of age. **J. Biol. Chem.**v. 261, n. 31, p. 14557- 14561, 1986

HARMS, P.G.; OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulationof the rat jugular vein. **J. Appl. Physiol.**, v.36, n.3, p.391-92, 1974.

HALLEEN, J.M.; ALATALO, S.L.; JANOKILA, A. J.; WOITGE, H. W.; SEIBEL, M. J.; VAANANEN, H. K. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. **Clin. Chem.**, v. 47, n. 3, p. 597-600, 2001.

HSIEH, Y.D.; DEVLIN, H.; ROBERTS, C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. **Arch. Oral Biol.**, v. 39, n.5, p. 425-4288, 1994.

IMAMURA, T.; LUEDKE, C.E.; VOGT, S.K.; MUGLIA, L.J. Oxytocin modulates the onset of murine parturition by competing ovarian and uterine effects. **Am J Physiol** ; v.279, n.3, p. R1061-R1067, 2000.

JEE, W.S.; MA, Y.F. The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone. **Bone**. v.21, n.4, p.297-304, 1997.

JENKINS, J.S.; NUSSEY, S.S.; The role of oxytocin: present concepts. **Clin. Endocrinol.**, v. 34, n.6, p.515-525, 1991.

KALU, D.N.; LIU, C.C.; HARDIN, R.R.; HOLLIS, B.W. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**., v.124, n.1, p. 7-16, 1989.

KWAN TAT, S.; PADRINES, M.; THEOLEYRE, S. HEYMANN, D.; FORTUN, Y.; IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Citokine Growth Factor Rev.**, v. 15, n.1, p. 49-60, 2004.

LANZILLOTTI, H.S.; LANZILLOTTI, R.S.; TROTTE, A.P.R.; DIAS, A.S.; BORNAND, B.; COSTA, E.A.M. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 2,p.181-193, 2003.

LONG, J. A.; EVANS, H. M.; The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Mem. Univ. Calif.**, v. 6, 1-148, 1922

LORENZO, J.A.; CANALIS, E.; RAIZS, L.G. Metabolic bone disease. In:KRONENBERG, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.; LARSEN, P.Q. **Williams testbook of endocrinology**. 11 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 1293-1294, 2008.

LUVIZUTO, E.R.; DIAS, S.M.D.; OKAMOTO, T.; DORNELLES, R.C.M.;
OKAMOTO, R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the
alveolar healing process in rats. **Arch Oral Biol.** v.56, n.10, p. 984-990, 2011.

LUVIZUTO, E.R.; DIAS, S.M.D.; QUEIROZ, T.P.; OKAMOTO,T.; GARCIA
JUNIOR, I.R.; OKAMOTO, R.; DORNELLES, R.C.M. Osteocalcin
immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats
treated with estrogen or raloxifene. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1021-1029, 2010.

MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms
and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr.
Rev.** v. 21, n.2, p-115-137, 2000.

MARTIN, R.B. Targeted bone remodeling involves BMU steering as well as
activation. **Bone**, v.40,n.6 p.1574–1580, 2007.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **Br. Dent. J.**, v. 172, n. 6, p. 235-242, 1992.

NAVEGA, M.T.; OISHI, J. Comparação da qualidade de vida relacionada à
saúde entre mulheres na pós-menopausa praticantes de atividade física com e
sem osteoporose. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n. 4, p. 258-264, 2007.

MUNDY, G.D.; OYAJOB, B.O. Bone remodeling. In: FAVUS MJ (Ed.). **Primer
on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.** 5
ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2003
p.43-58.

NEER, R.M.; ARNAUD, C.D.; ZANCHETTA, J.R.; PRINCE, R.; GAICH, G.A.; REGINSTER, J. Y.; HODSMAN, A. B.; ERIKSEN, E. F.; ISH-SHALOM, S.; GENANT, H. K.; WANG, O.; MITLA, K. Effect of parathyroid hormone on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v.344, n. 19, p.1434-1441, 2001.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. **Rev. Fac. Odontol. Araçatuba**, v. 2, n. 2, p.153-169, 1973.

OKAMOTO, T.; FIALHO, A.C.V. Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, V. 19, n. 1, 63-74, 1990.

PETERSSON, M.; LAGUMDZIJA, A.; STARK, A.; BUCHT, E. Oxytocin stimulates proliferation of human osteoblast-like cells. **Peptides**, v. 23, n. 6, p. 1121-1126, 2002.

POOLE, K.E.; TREECE, G.M.; RIDGWAY, G.R.; MAYHEW, P.M.; BORGGREFE, J.; GEE, AH. Targeted regeneration of bone in the osteoporotic human femur. **PLoS. One**, v. 6, n.1, p. e1619, 2011.

PRAKASH D, BEHARI J. Synergistic role of hydroxyapatite nanoparticles and pulsed electromagnetic field therapy to prevent bone loss in rats following exposure to simulated microgravity. **Int J Nanomedicine**.v. 4, p. 133-144 2009.

RAISZ L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J Clin Invest.**, v. 115, n. 12, p. 3318-3325, 2005.

ROBERTS, M.D.; SANTNER, T.J.; HART, R.T. Local bone formation due to combined mechanical loading and intermittent hPTH-(1-34) treatment and its

correlation to mechanical signal distributions. **J. Biomech.**, v.42, n. 15, p.2431-2438, 2009.

ROBEY, P.G.; BOSKEY, A.L. Extracellular matrix and biomineralization of bone. In: FAVUS, M.J. (Ed.) **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 5. Ed. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research, 2003. P. 36-46.

ROUX, C.; BRIOT, K.; HORLAIT, S.; VARBANOV, A.; WATTS, NB.; BOONEN, S. Assessment of non-vertebral fracture risk in postmenopausal women. **Ann. Rheum. Dis.**, v.66, n. 7, p.931–935, 2007.

RUSSO, L.A.T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n.4, p. 401-406, 2001.

SARAIVA, G.L.; LAZARETTI, M. C. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.46, n.1, p. 72-78, 2002. .

SEIBEL, M.J. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. **Osteoporos. Int.**, v.11, suppl 6, p.518-529, 2000.

SINGER, B.R.; MCLAUCHLAN, G.J.; ROBINSON, C.M.; CHRISTE, J. Epidemiology of fractures in 15,000 adults: the influence of age and gender. **J Bone Joint Surg**, v. 80, p. 243-248, 1998.

SOLOFF, M.S.; JENG, Y.J.; COPLAND, J.A.; STRAKOVA, Z.; HOARE, S. Signal pathways mediating oxytocin stimulation of prostaglandin synthesis in select target cells. **Exp. Physiol.**, v. 85, n^o esp., p. 51S-58S, 2000.

TAMMA, R.; COLAIANNI, G.; ZHU, L.L.; DIBENEDETTO, A.; GRECO, G.; MONTEMURRO, G.; PATANO, N.; STRIPPOLI, M.; VERGARI, R.; MANCINI, L.; COLUCCI, S.; GRANO, M.; FACCIO, R.; LIU, X.; LI, J.; USMANI, S.; BACHAR, M.; BAB, I.; NISHIMORI, K.; YOUNG, L.J.; BUETTNER, C.; IQBAL,

J.; SUN, L.; ZAIDI, M.; ZALLONE, A. Oxytocin is an anabolic bone hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.106, n.17, p.7149-7154, 2009.

TANG, S.Y.; ZEENATH, U.; VASHISHTH, D. Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. **Bone**, v. 40, n.4, p. 1144-1151, 2007

USTÁRIZ, F.; AREVALO GONZALEX, E.; BECERRA DE PABLOS, G.; MONSALVE, L.; HERNANDEZ, G.; MOLINA, F.; LUCENA, M. Determinación de niveles de fósforo inorgánico y fosfatasa alcalina en jóvenes del Estado Mérida-Venezuela. **Rev. Fac. Farm.**, v. 34, p. 30-34, 1998.

WAHL, R.U. Could oxytocin administration during labor contribute to autism and related behavioral disorders? A look at the literature. **Med Hypotheses**, v. 663, n.3, p. 456-460, 2004.

WANG, X.; SHEN, X.; LI, X.; AGRAWAL, C.M. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. **Bone**,v. 31,n. 1, p. 1-7, 2002.

ZINGG, H.H.; LAPORTE, S.A. The oxytocin receptor. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v.14,n.5, p.222–227, 2003.

ANEXO A

Certificado Comissão de Ética na Experimentação Animal

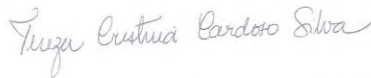


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**ANÁLISE DA AÇÃO DA OCITOCINA SOBRE A REMODELAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM RATAS WISTAR SENIS**" sob responsabilidade **Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dorneles** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 10/09/2009 de acordo com o protocolo 2009-005746.

Araçatuba, 10 de Setembro de 2009



Prof.ª Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP